



Inflammation chronique et hyperactivation du système immunitaire chez les patients HIV controllers : liens avec le contrôle antiviral et la mise en jeu de la voie des interférons

Nicolas Noel

► To cite this version:

Nicolas Noel. Inflammation chronique et hyperactivation du système immunitaire chez les patients HIV controllers : liens avec le contrôle antiviral et la mise en jeu de la voie des interférons. Immunologie. Université Paris Sud - Paris XI, 2014. Français. <NNT : 2014PA114846>. <tel-01223583>

HAL Id: tel-01223583

<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01223583>

Submitted on 3 Nov 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Comprendre le monde,
construire l'avenir®



UNIVERSITÉ PARIS-SUD

ÉCOLE DOCTORALE 425 :
INNOVATION THÉRAPEUTIQUE : DU FONDAMENTAL À L'APPLIQUÉ

Laboratoire : Unité INSERM U1012
Régulation de la réponse immune, infection VIH-1 et autoimmunité

Thèse de Doctorat

Discipline : Immunologie

par

Nicolas NOEL

INFLAMMATION CHRONIQUE ET HYPERACTIVATION DU SYSTEME IMMUNITAIRE CHEZ
LES PATIENTS HIV CONTROLLERS : LIENS AVEC LE CONTROLE ANTIVIRAL ET LA MISE
EN JEU DE LA VOIE DES INTERFERONS

Date de soutenance : 28/11/2014

Composition du jury :

| | | |
|----------------------|--|---|
| Président de Jury : | Professeur Jean-François DELFRAISSY | (PU-PH, Hôpital Bicêtre) |
| Directeur de thèse : | Professeur Olivier LAMBOTTE | (PU-PH, Hôpital Bicêtre) |
| Rapporteurs : | Docteur Remi CHEYNIER Professeur Pierre DELOBEL | (Directeur de Recherche, Institut Cochin) (PU-PH, CHU Toulouse) |
| Examineurs : | Professeur Brigitte AUTRAN Docteur Bruno VASLIN | (PU-PH, Hôpital Pitié Salpêtrière) (Directeur de Recherche, CEA) |

On en parle peut être pas assez, mais une thèse, tout seul, ça ne peut pas se faire...

J'ai choisi de répartir les remerciements à chaque page. Il n'y a pas de suite logique, pas d'ordre de préférence, chacun prend celle qui lui convient...

A part la première page...

*Tout d'abord, il faut reconnaître que sans toi, Dorothée, tout ce qui suit n'existerait pas.
Je vais rassurer les membres du Jury, ce n'est pas de l'usurpation d'identité, ce n'est pas non plus toi qui a fait les manips...*

N'empêche, tu as eu beaucoup de courage pour supporter ces trois (longues.. sisi, j'insiste...) années de thèse, en particulier sur les 3 derniers mois où, entre la salle, l'écriture et les allers-retours administratifs, les insomnies ont été plus fréquentes que les nuits complètes !

C'est notamment grâce à toi que je me suis inscrit dans cette aventure, c'est toi qui as su trouver les ressources qui ont pu me manquer avant de m'y lancer.

Au cours de ces années, tu es devenue incollable en PCR qui ratent, en cytométrie de flux qui bave, en trieur qui plante, en cultures cellulaires contaminées, en données à rattraper, en patients à prélever, en mails à écrire (même très tard)...

En bref, tu as été formidable (tu vois, je l'ai placé), et même si la page pleine que tu m'as demandé, c'est beaucoup, tu l'as méritée !

Merci pour ta patience, ta réassurance aux moments où je me suis demandé « pourquoi tout ça », les courses, les repas, les... j'en ai un peu fait quand même, non ?

Merci pour ton soutien infailible (même si, au final, tu as réussi à ne pas relire cette thèse en entier !),

*Pour les week-ends en amoureux,
Pour les semaines en amoureux,
Pour les vacances entre copains,
Pour t'être mise au ski,
Pour m'avoir mis à la plongée,
Pour s'être fait casser 5 fois la voiture en 3 ans et avoir 1 fois failli y rester,
Pour le mariage sur la plage, que finalement, on n'aura pas fait à la plage,
Pour m'avoir forcé à sortir,
Pour m'avoir ensuite forcé à travailler,*

Pour ne pas avoir pu se coucher tous les soirs en même temps...

Pour tous ces moments qui rythment notre quotidien,

Merci, ma femme, ma moitié (et demie : ça y est, on peut le dire !)

Ensuite, je dois rendre grâce à mon mentor : Olivier, sans vouloir me répéter, merci d'avoir été là, d'être un soutien, un modèle souvent, un ami.

Cette thèse a été l'occasion d'approfondir nos liens, que je sais solides, et de poursuivre notre relation de travail.

11 ans maintenant que j'apprends à tes côtés (ça fait mal, hein...), que tu m'as épaulé, guidé dans mes choix pas toujours simples, que tu m'as relu, poussé, corrigé... stimulé...

Merci pour tout, en souhaitant que cette collaboration se poursuive longtemps ;

Un grand merci à M. le Pr Delfraissy pour avoir accepté d'être Président de mon Jury de Thèse. Ce symbole est pour moi très important. Après avoir été étudiant en stage de soins infirmiers, externe, puis interne, puis post-interne et enfin chef de clinique dans le service, la boucle est bouclée !

Merci au Dr Cheynier et au Pr Delobel pour avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse, pour vos commentaires précieux et vos optimisations !

Merci à Mme le Pr Autran et au Dr Vaslin d'avoir accepté d'être examinateurs de ma thèse,

Une mention tout particulière pour mes parents, qui m'ont avoué « ne pas comprendre ce que je faisais : ça fait pas un peu long, une deuxième thèse ? »

Vous avez vu, j'ai fini par commencer à travailler un tout petit peu avant votre retraite...

Promis, Maman, je n'en ferai pas de troisième !

Promis, Papa, je vais essayer de te faire comprendre un jour ce que je fais...

Merci pour votre soutien et votre présence ;

A Emilie, ma sœur, si loin : je pense à toi quand même, même si je reconnais un handicap notable à mon utilisation du téléphone !

Peut être qu'un jour, ces 800 kms qui nous séparent se réduiront,

En attendant, je vais maintenant tâcher de me faire un peu plus proche maintenant que cette thèse est rendue,

Merci à Caroline et Christian de m'avoir permis d'épouser votre fille, j'aurais été bien embêté si vous aviez dit non, merci à Claire d'être ma belle-sœur, merci à David d'être mon (presque) beau-frère ;

A toute ma famille, proche ou éloignée : merci d'être là ;

Merci à toutes les personnes « de science » avec lesquelles j'ai encore le plaisir de travailler, ou dont j'ai croisé le chemin :

Etienne, tu trouves ici pour la première fois ta place ici, tu reviendras plus bas, merci avoir accepté de faire ton M2 un peu avec nous malgré cette année « particulière », à très vite pour le reste, mon vieux...

Camille & Christine, pour les moments de craquage dans votre bureau,

Merci au Pr Marc Tardieu de m'avoir accepté au sein de son laboratoire et soutenu dans les démarches que j'ai entreprises,

Alain, Martine, Stéphane, Kim, Sandie, Isa, Saida, Marie-Ghislaine, Salma, Maïsa, Houria, Minh, Philippe, Michele, tous ceux que j'oublie à l'U1012,

A mes collègues encore en Thèse : Gaëtane, Raouf : la route est longue mais à la fin elle est belle...

Merci à Asier, Gianfranco, Michaela, Mickaël et aux personnes de l'institut Pasteur,

A Laurence, Azeb, Samia, Faroudy, et toute l'U1018,

A Mmes Christine Rouzioux et Véronique Avettand à Necker,

A MM. Roger Legrand et Bruno Vaslin au CEA,

A Mme Carine Van Lint à Bruxelles,

A Mme Catherine Dunyach-Remy et M. Jean-Philippe Lavigne à Nîmes,

A Mme Julia Garcia Prado et M. Javier Martinez Picado à Barcelone,

Merci à tous les collègues hospitaliers,

Merci à toi, Cécile, de m'avoir accepté tout d'abord comme « post-interne » en HDJ durant ma première année de Thèse, tout en allant au labo 4/5 ème de mon temps, et de m'avoir autorisé à revenir comme CCA...

*Merci pour ton soutien amical et tes encouragements en cette fin de thèse,
J'espère que nos collaborations pourront se poursuivre longtemps, tant au niveau hospitalier que du côté du labo !*

Merci à mes collègues de mon « quotidien actuel » : Nathalie, Claire, Elina, Felix, Philippe, Olivier S., Christelle, Pilar, Agnès, Cathy, Laurence, celles et ceux qu'inévitablement j'oublie,

A mes internes qui ont supporté mes absences et – parfois – mon humeur : Anaïs, Alice, Patricia, Ségolène, Marie, Valentine, Perrine, Vincent, Anne, Laura, Agnès, Tomas ;

A nos formidables infirmières de M2I,

A mes « autres mentors », anciens patrons et actuels collègues : Pr Mariette, Pr Miceli, Pr Femand, Pr Ronco, Pr Boffa, Dr Caen, Dr Choukroun, Dr Verny, Dr Gonzalez, Dr Rabier, Dr Petitpretz, Dr Azarian,

Une mention spéciale pour les gens « du boulevard de l'hôpital », Dr Saadoun et Pr Cacoub, pour nos collaborations passées, actuelles et à venir,

*Au Pr Lortholary pour son soutien et ses encouragements,
Aux Pr Godeau, Michel, Khellaf, aux Drs Limal, Guillaud et Bartolucci : ne changez rien !*

A tous mes collègues et amis de l'hôpital, la liste est trop longue...

Pour finir, merci à mes amis, pour leur soutien infaillible et leur présence.

A Táí, mon pote, mon témoin, mon vieux frère : merci pour toutes ces années. Les épreuves de la vie nous ont rapprochés, qu'il s'agisse des moments heureux ou parfois plus difficiles. Je te passe le flambeau maintenant pour terminer le concours de « l'internat (et le post-internat !) le plus long du monde » : c'est toi qui a gagné, moi j'arrête là !!

A mes amis de tous les jours : Elsa, Milie, Claire, Benj, Etienne, pour tous ces moments. Même si la Thaïlande paraît un peu loin, on pourra se refaire ça avec les enfants ?

Aux Huit Fois Rien, morts pour de bon ou bien ? Bolboth, Táí, Seb, Masto, Ludo, Romain, François, Patrick : vous et vos pouets me manquez, les gars...

A Jim pour sa présence, même de plus loin, et son soutien moral ! Prends soin de Jess et de tes filles,

A Quentin et Gaëlle, pour qu'on arrive à se voir vraiment,

A Noémie, amie de toutes ces années, je te souhaite (enfin) beaucoup de bonheur !

A tous les copains du service après vente, de KB et d'ailleurs, sans distinction d'âge, de genre, de nom, ou de forme... Persi, Galou, Marion, John, Caro, Marianne, Maké, Amélie, Gatal, Marie, Manu, Pauline, Momo, Lydie, Bigorn, Zazz, Estelle, Valoche, Benj B, Julie B, Martin, SebO, Clem, Dewi, Max, les autres...

Aux Franco-Allemands, une partie de ma famille quand même, Justine, Coline, Julie, Thibault,

A Charlotte et Babou, Guigui et Yo, pour tout,

A Aurore et Yo, Marc et Maureen, pour le reste !

A Sylvain et Maria, soyez heureux, à Anne et Richard, François et Solène,

A la Toudon's team pour ces vacances dantesques qui m'auront permis de boucler ce manuscrit, Charlotte, Guigui, Babou, Yo, Caro D, Phildar...

LISTE DES ABREVIATIONS

AcN : anticorps neutralisant
ADCC : antibody dependent cell cytotoxicity
ALT : (patient) asymptomatique à long terme
APOBEC : apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like
ARN : acide ribonucléique
ARV : antirétroviraux

BST-2 (Tetherin) : Bone marrow stromal cell antigen 2

CDK9 : cyclin-dependent kinase 9
CMSPs : cellules mononuclées du sang périphérique
CoDEx : Cohorte des Extrêmes (ANRS CO21)
CRP : C-reactive protein

DC : dendritic cell (pDC : plasmacytoid, mDC : myeloid)
DPP4 : dipeptyl-peptidase 4
DR5 : death receptor 5

EC : (patient) elite controller
EndoCAB : endogenous endotoxin core antibody

FCLR4 : Fc receptor-like-4
FIRST : Flexible Initial Retrovirus Suppressive Therapies

HIC : (patient) HIV controllers
HLA : human leukocyte antigen

ICAM1 : Intercellular Adhesion Molecule 1
I FABP : intestinal fatty acid binding protein
IFIT1 : Interferon-induced protein with tetratricopeptide
IFITM1 : Interferon-induced transmembrane protein 1
IFN : Interferon
IFNAR : IFN α/β receptor
IKK : I κ B kinase
IP10 : Interferon-gamma inducible protein 10
IRF : Interferon regulatory factor
ISGs : Interferon stimulated genes
ISRE : IFN-stimulated response element

JAK : Janus kinase

KIR : killer cell immunoglobulin like receptor

LB : lymphocyte B
LBP : LPS-binding protein
LPS : lipopolysaccharide
LT (CD4, CD8) : lymphocyte T

LTNP : long-term non progressor

MAVS : Mitochondrial antiviral-signaling protein

MDA5 : melanoma differentiation antigen 5

MIC (A, B) : MHC class I polypeptide-related sequence (A, B)

Mx (A, B) : Myxovirus resistance (A, B)

NEMO :NF- κ B Essential Modulator

NK : natural killer

PAI-1 : plasminogen-activator inhibitor 1

PCR : polymerase chain reaction

PD-1 : programmed cell death 1

PKR : Protein Kinase RNA-activated PNH : primate non humain

PNN : polynucléaire neutrophile

PVVIH : personne vivant avec le VIH

SAMHD1 : SAM domain and HD domain-containing protein 1

SIDA : Syndrome d'Immunodéficience acquise

SIV : simian immunodeficiency virus

sjTREC : signal joint T Cell Receptor excision circles

STAT : Signal Transducers and Activators of Transcription

RIG-I : retinoic acid-inducible gene I

RLR : RIG-I like receptor

Siglec 6 : Sialic acid-binding immunoglobulin-type lectins 6

SMART :Strategies for Management of AntiRetroviral Therapy

SOCS : suppressor of cytokine signalling

TBK-1 : TANK-binding kinase 1

TLR : Toll-like receptor

TNF : tumor necrosis factor

TRAF3 : TNF receptor-associated factor 3

TRAIL : tumor-necrosis-factor related apoptosis inducing ligand

TRIM5 α : Tripartite motif-containing protein 5

VCAM1 : vascular cell adhesion molecule 1

VIH : Virus de l'immunodéficience humaine

VSIG : viral-stress inducible gene

| | |
|--|-----------|
| LISTE DES ABREVIATIONS | 11 |
| INTRODUCTION | 15 |
| I. Physiopathologie de l'infection et réponse immunitaire anti-VIH : à l'origine de l'activation du système immunitaire et de l'inflammation..... | 19 |
| 1. Structure du VIH, cycle de vie et évolution naturelle | 19 |
| 2. Les réponses immunitaires anti-VIH et leurs liens avec l'inflammation | 23 |
| 2.1. Le rôle de l'immunité muqueuse : défenses précoces anti-VIH et translocation bactérienne | 23 |
| 2.2. Les acteurs de la réponse immune impliqués dans la genèse de l'inflammation | 27 |
| 2.2.1. Les acteurs cellulaires de l'immunité innée | 27 |
| 2.2.2. Cascade cytokinique au cours de l'infection par le VIH : rôle des Interférons et genèse de l'inflammation | 34 |
| 2.2.3. Gènes induits par l'interféron | 40 |
| 2.3. Réponse immunitaire adaptative et activation lymphocytaire..... | 45 |
| 2.3.1. Réponse lymphocytaire T CD8 | 45 |
| 2.3.2. Réponse lymphocytaire T CD4 | 48 |
| 2.3.3. Réponse lymphocytaire B et immunité humorale..... | 50 |
| II. Inflammation systémique au cours de l'infection par le VIH | 52 |
| 1. Constat d'une inflammation exagérée lors de l'infection par le VIH : poids de l'IL6, de la CRP et des D-Dimères | 52 |
| 2. Autres biomarqueurs d'inflammation et d'activation immunitaire | 54 |
| 2.1. Marqueurs solubles | 55 |
| 2.2. Marqueurs cellulaires | 57 |
| 3. Génèse de l'inflammation au cours de l'infection par le VIH..... | 59 |
| III. Modèles de contrôle de l'infection par le VIH..... | 63 |
| 1. Modèles simiens..... | 63 |
| 2. Modèles humains | 68 |
| 2.1. Pathogénicité du virus | 70 |
| 2.2. Susceptibilité de l'hôte et immunité naturelle antivirale | 71 |
| 2.3. Rôle de l'immunité cellulaire T CD8..... | 73 |
| 2.4. Rôle de l'immunité cellulaire T CD4..... | 75 |
| 2.5. Rôle de l'immunité humorale | 76 |
| 2.6. Devenir des patients HIV controllers et risque de progression | 77 |
| 3. Données d'activation immune et d'inflammation dans les modèles de contrôle du VIH..... | 78 |
| OBJECTIFS DES TRAVAUX | 81 |

| | |
|---|------------|
| RESULTATS | 83 |
| TRAVAIL N°1 – Elevated IP10 levels are associated with immune activation and low CD4 T cell counts in HIV controller patients..... | 84 |
| TRAVAIL N°2 - Strong <i>ifitm1</i> expression in CD4 T cells in HIV controllers is correlated with immune activation | 99 |
| TRAVAIL N°3 - Immunological and virological progression in HIV controllers: role of viral “blips” and immune activation -the ANRS C021 CODEX study | 121 |
| DISCUSSION | 150 |
| REFERENCES | 183 |
| ANNEXES | 216 |
| Annexe 1 – Les patients HIV controllers : un modèle de contrôle spontané de l’infection par le VIH | 217 |
| Annexe 2 - NKG2D expression on HIV-Specific CD8 + T cells is reduced in viremic HIV-1 infected patients but maintained in HIV controllers | 226 |
| Annexe 3 –Communications des travaux de thèse..... | 231 |
| RESUME EN FRANÇAIS..... | 232 |
| SUMMARY | 233 |
| RESUME | 235 |

INTRODUCTION

Actuellement, les estimations portent à plus de 35.3 millions les personnes vivant avec le VIH (PVVIH) dans le monde (Maartens et al., 2014). Depuis l'avènement des thérapies antirétrovirales (ARV), au milieu des années 1990, cette prévalence estimée de personnes infectées a augmenté, puisque les PVVIH vivent de plus en plus longtemps. La mortalité associée au VIH concernait 2.3 millions de personnes en 2005, contre 1.6 millions en 2012 – plus de 50% des causes de décès n'étant pas directement imputable au SIDA. Il a en effet été estimé, chez les patients infectés par le VIH1 à l'ère des ARV (1996-2006), que les principales causes de décès étaient la survenue de cancers, de pathologies cardiovasculaires, et de pathologies hépatiques (Antiretroviral Therapy Cohort Collaboration, 2010). Des résultats similaires ont été obtenus dans l'analyse des causes de décès en France entre 2000 et 2010 (Morlat et al., 2014), suggérant une part de plus en plus importante de la morbidité et mortalité non liée au SIDA, mais associée à une complication majeure : l'inflammation chronique.

Une partie des efforts de la recherche actuelle contre le VIH a pour but la prévention de nouvelles transmissions et un déclin dans la progression de l'infection, ainsi qu'un meilleur accès au diagnostic et aux traitements dans différents pays du Monde. En parallèle, de nombreuses équipes combinent leurs efforts visant à obtenir une guérison. Cette « cure » peut-être fonctionnelle, avec la persistance de faibles quantités de virus mais sans répllication détectable en l'absence de traitement anti-rétroviral. Dans ce contexte, le modèle des patients HIV controllers est intéressant (Lambotte et al., 2005). Ces patients présentent sur le long terme une charge virale VIH spontanément indétectable sans traitement antirétroviral, et sont colligés en France au sein de la cohorte des extrêmes CODEX. La définition actuelle est une durée d'infection connue depuis au moins 5 ans avec les 5 dernières charges virales < 400 copies/mL. Par ailleurs,

l'identification de patients contrôlant la réplication du VIH durablement post-arrêt de traitement (Sáez-Cirión et al., 2013) est un argument supplémentaire pour la faisabilité d'une approche intéressante de guérison fonctionnelle. L'objectif de « cure » est également celui d'une guérison « réelle » aboutissant à l'éradication des réservoirs viraux. Enfin, la recherche vaccinale, préventive comme curative, progresse grâce à une meilleure connaissance des liens immunovirologiques entre le pathogène et son hôte (Lewin et al., 2014).

Une réduction de la morbidité « non-classante SIDA » pour les PVVIH chroniques, pour lesquels les traitements ne peuvent à ce jour être arrêtés, est cependant indispensable. L'analyse des facteurs favorisant ces complications est complexe, mais a fait se dégager le rôle de l'activation prolongée du système immunitaire et de l'inflammation chronique à bas bruit (Paiardini and Müller-Trutwin, 2013). De multiples causes concourent à l'établissement et au maintien de cette activation immunitaire, entre autres : la réplication virale, une altération précoce des barrières muqueuses, l'activation immunitaire cellulaire en découlant, la voie Interferon... Le rôle des monocytes semble de plus en plus important à caractériser, ces cellules pouvant constituer un pont entre l'activation immunitaire innée et l'inflammation persistante systémique et tissulaire (notamment cardiovasculaire et cérébro-méningée)(Campbell et al., 2014).

Au cours de ce travail, nous avons caractérisé les paramètres d'inflammation des patients HIV controllers suivis dans la cohorte Française CODEX. Nous avons également voulu voir quelles étaient les causes de cette inflammation chez ces patients ne présentant ni réplication virale importante, ni infection opportuniste, ni traitement au long cours, ainsi que les conséquences de cette inflammation sur le maintien au long

cours du contrôle antiviral. Enfin, nous avons analysé chez ces patients la production de gènes induits par l'interféron, une des cytokines antivirales majoritaires, au sein de différentes sous-populations de cellules immunitaires, notamment les monocytes.

I. Physiopathologie de l'infection et réponse immunitaire anti-VIH : à l'origine de l'activation du système immunitaire et de l'inflammation

Le VIH est un rétrovirus à ARN dont la pathogénie résulte de l'invasion dans l'organisme par voie sanguine ou muqueuse (sexuelle essentiellement). En l'absence de traitement, il infecte les cellules exprimant le CD4 et les corécepteurs CCR5 et/ou CXCR4, se réplique dans les tissus et entraîne une diminution des LT CD4 (LT CD4) dans le sang comme dans les organes lymphoïdes, conduisant à une situation de déficit immunitaire cellulaire sévère.

1. Structure du VIH, cycle de vie et évolution naturelle

Ce rétrovirus a été identifié et caractérisé en 1983 (Barré-Sinoussi et al., 1983). Il s'agit d'un virus enveloppé à ARN, disposant d'une enzyme, la transcriptase inverse, permettant la rétro-transcription de l'ARN viral en ADN, avant son intégration dans le génome de la cellule cible. Les gènes du virus produisent des protéines de structure, Gag, Pol et Env, ainsi que des protéines virales dites accessoires, Tat, Rev, Vif, Vpr, Vpu et Nef (**Figure 1**). Toutes ces protéines sont impliquées dans la reconnaissance membranaire ou intracellulaire du virus par l'hôte et l'activation d'une réponse immunitaire innée ou spécifique.



Figure 1. Représentation schématique du génome du VIH-1, d'après Colin et Van Lint (Colin and Van Lint, 2009)

Les cibles principales du virus du VIH sont les LT CD4 activés et les macrophages. Après son entrée dans l'organisme, le virus, *via* ses protéines de structure gp120 et gp41, codées par *Env*, s'amarre au récepteur CD4 ainsi qu'à un corécepteur – CCR5 ou CXCR4. Le tropisme du VIH pour ce corécepteur dépend de mutations d'acides aminés dans la boucle V3 de la gp120, et varie en fonction du temps – le tropisme R5 étant privilégié au début de l'infection et le tropisme X4 plus tard dans l'évolution. Ainsi, les cibles de l'entrée du VIH sont toutes les cellules exprimant le CD4 et ses corécepteurs : LT CD4, monocytes/macrophages, cellules dendritiques. Certaines cellules n'exprimant pas le CD4 mais exprimant les corécepteurs peuvent être infectées (astrocytes, cellules épithéliales rénales). Ensuite, la machinerie cellulaire de l'hôte est détournée afin de produire de nouvelles particules virales, qui vont infecter d'autres cellules de proche en proche (**Figure 2**).

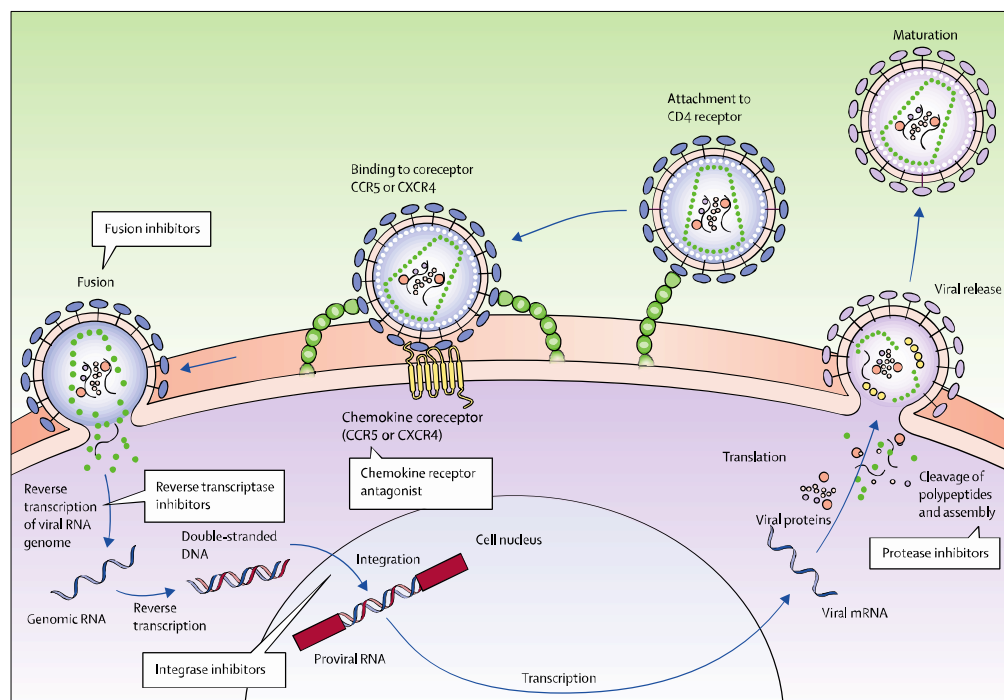


Figure 2: HIV life cycle showing the sites of action of different classes of antiretroviral drugs

Adapted from Walker and colleagues,³⁶ by permission of Elsevier.

Figure 2. Cycle du VIH et étapes ciblées par les thérapies antirétrovirales. D'après Maartens et al (Maartens et al., 2014).

Sans traitement, le profil de l'infection par le VIH a longtemps comporté trois phases (**Figure 3**):

- la phase de primo-infection, survenant dans les semaines post-infection et associée à une charge virale VIH très importante, et souvent une lymphopénie circulante CD4
- la phase chronique, asymptomatique, durant plusieurs années en général avec une progression vers le déficit immunitaire CD4
- le stade SIDA, défini par la survenue d'une infection opportuniste ou d'une autre pathologie classant SIDA, telles certaines tumeurs, selon les stades de la CDC (Atlanta, 1993)

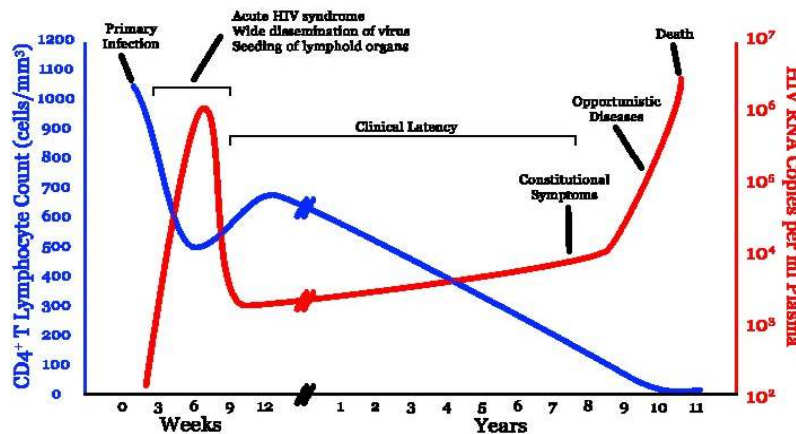


Figure 3. Phases de l'infection par le VIH et évolution naturelle sans traitement, aboutissant inéluctablement à la baisse des LT CD4 et au décès.

La caractéristique principale de l'infection par le VIH est la baisse des LT CD4, dont le mécanisme n'est pas identique selon les stades de la maladie. En effet, au cours de la primo-infection, la déplétion des LT CD4 est rapide mais transitoire, et son mécanisme reste mal compris. Dans le modèle simien, une migration des LT CD4 de la périphérie vers les sites infectés (muqueuses, ganglions) explique en partie la baisse du taux de LT CD4 circulants. Par ailleurs, l'infection par le virus des cellules CD4+CCR5+,

principalement au niveau digestif, contribue à leur destruction (Brenchley et al., 2004; Mattapallil et al., 2005; Veazey et al., 2000).

Au cours des phases suivantes de la maladie, le poids de différents facteurs dans la destruction des lymphocytes CD4 d'une part, leur absence de renouvellement d'autre part, est important (McCune, 2001). Ainsi, comme nous allons le revoir, le rôle de l'activation immune et de l'inflammation systémique est fondamental, associé à l'expression de marqueurs de sénescence et d'épuisement, ainsi qu'à la mise en route de voies de l'apoptose conduisant à la mort des LT CD4 infectées comme non infectées (Appay and Sauce, 2008; Deeks et al., 2004; Kaufmann and Walker, 2009; McCune, 2001). Enfin, les dysfonctions thymiques ainsi que la fibrose collagène, favorisée par l'exposition au long cours à des cytokines pro-fibrosantes comme le TGF β en réponse à des mécanismes de cicatrisation dérégulés, contribuent aux altérations de l'homéostasie lymphocytaire (Estes et al., 2007; Zeng et al., 2011).

Durant ces phases, l'impact des traitements antirétroviraux est notable. En effet, ces traitements permettent de réduire la charge virale du VIH, et ainsi d'optimiser la restauration immunitaire T CD4. Ils diminuent ainsi la morbidité et la mortalité associées aux infections opportunistes et aux affections classant SIDA, ainsi que l'activation du système immunitaire et ses conséquences néfastes, comme le risque cardiovasculaire et l'épuisement lymphocytaire (Maartens et al., 2014). Néanmoins, ces traitements ne permettent pas l'éradication du virus, qui persiste à l'état de latence dans des réservoirs cellulaires ou des sanctuaires tissulaires plus difficilement accessibles à la diffusion des traitements (Lambotte et al., 2004; Trono et al., 2010). En outre, comme nous allons le revoir, ils ne permettent pas la réduction des paramètres d'activation

immunitaire au même niveau que des personnes n'ayant jamais été infectées (Eastburn et al., 2011; Lederman et al., 2011; Wilson et al., 2014).

Ainsi, l'évolution de l'infection par le VIH est marquée par le rôle de la réplication virale et la baisse des LT CD4. Dans ce contexte, la réponse immunitaire anti-VIH se met en place rapidement mais ne peut éradiquer le virus.

2. Les réponses immunitaires anti-VIH et leurs liens avec l'inflammation

2.1. Le rôle de l'immunité muqueuse : défenses précoces anti-VIH et translocation bactérienne

L'exposition au VIH n'induit que rarement une infection productive du fait de différents mécanismes de protection naturelle (barrières physiques, production d'IgA...)(Shacklett, 2010). Une fois les premières barrières franchies, le virus atteint les muqueuses qu'il infecte, et gagne les premiers relais ganglionnaires sous-muqueux. Cette étape est cruciale pour plusieurs points :

- (i) dès cette étape, la réplication virale au niveau muqueux est très importante et le VIH infecte les cellules CD4 sous-muqueuses
- (ii) la barrière naturelle que constitue le tissu lymphoïde associé aux muqueuses (MALT) constitue une partie essentielle du système immunitaire, et s'active en réponse à l'infection et initie la coordination de l'activation du système immunitaire
- (iii) les altérations de la muqueuse digestive peuvent être très importantes, et ne se corrigeront pas totalement sous traitement (Brenchley et al., 2006; Hunt et al., 2014)

- (iv) ces altérations, en phase chronique, peuvent favoriser le passage transmuqueux de produits microbiens, entretenant, comme ne le reverrons, l'activation chronique du système immunitaire (Haynes, 2006)

(Figure 4)

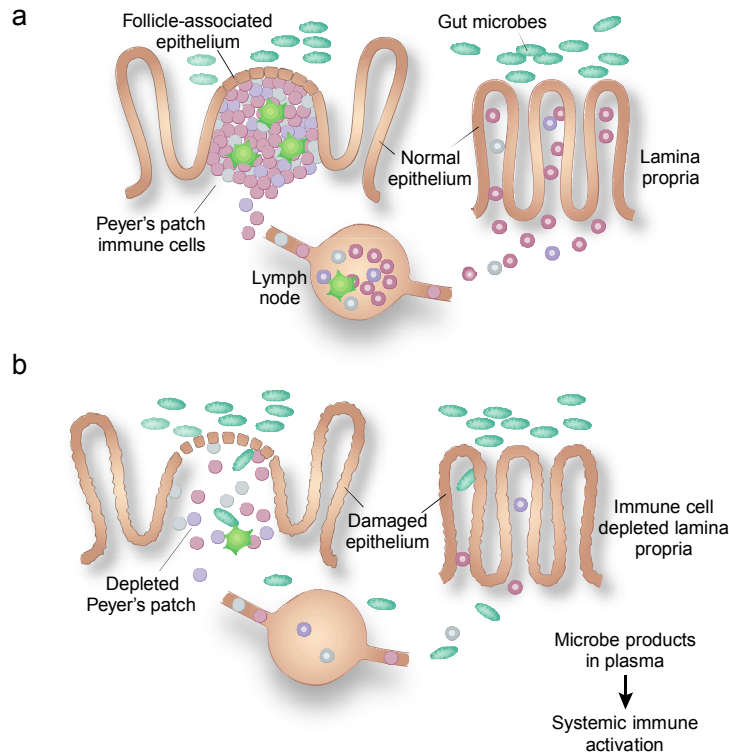


Figure 4. Représentation des altérations de la muqueuse digestive survenant au cours de l'infection par le VIH. (A) : Situation physiologique, épithélium normal. (B) : Infection par le VIH, provoquant un endommagement de l'épithélium digestif et la

déplétion du système immunitaire local (plaques de Peyer, cellules résidentes), permettant le passage sanguin de produits microbiens contribuant à l'activation immunitaire. D'après B.Haynes (Haynes, 2006)

Les étapes très précoces de la primo-infection ont pu être détaillées dans les modèles simiens. Ainsi, le virus est tout d'abord confronté à l'effet des barrières muqueuses, qui ont pour rôle de limiter l'accès aux cellules cibles de la *lamina propria* (Haase, 2005). Une faible proportion de virus réussit à passer ces premières barrières, par des mécanismes de transport *via* les cellules dendritiques, des altérations physiques des

barrières muqueuses, ou des mécanismes de transcytose (Shattock and Moore, 2003). Le virus infecte ensuite ses cibles (lymphocytes T CD4 résidents, cellules dendritiques, macrophages) (Hladik and McElrath, 2008; Zhang et al., 1999), qui vont ensuite participer à la production de nouveaux virions et à la dissémination de l'infection. A ce niveau, le virus infecte préférentiellement les cellules exprimant le co-récepteur CCR5 (plutôt que CXCR4) (Keele et al., 2008a).

Par la suite, l'infection va gagner les tissus lymphoïdes et devenir systémique. En quelques jours, la production de virus passe alors du stade « indétectable » à un pic de charge virale mesuré par la quantité d'ARN viral/mL vers 10-14 jours (Haase, 2005). Dans le même temps, la destruction des LT CD4 débute au niveau du tissu lymphoïde associé aux muqueuses, et une cascade cyto/chimiokinique se produit (Schacker et al., 2001; Stacey et al., 2009). Cette production de cytokines est importante, car elle participe au déclenchement de la cascade immunitaire visant à activer les cellules de l'immunité adaptative et assurer leur recrutement. Ces données ont été validées chez l'Homme lors de temps plus tardifs de l'infection, l'accès aux temps très précoces étant limité (Stacey et al., 2009).

Parmi les marqueurs associés aux altérations de la barrière muqueuse, la translocation de produits microbiens a été caractérisée depuis le début des années 2000 (Brenchley et al., 2006). En particulier, les taux du lipopolysaccharide (LPS) bactérien sont élevés dans le sang des patients infectés, et se réduisent sous traitement ARV sans pour autant revenir au niveau des personnes non infectées. Ce LPS va secondairement interagir avec les monocytes et les activer, conduisant ainsi à l'entretien de l'inflammation et de l'activation du système immunitaire au long cours. Comme nous le reverrons, ceci

conduit à la production de CD14 soluble, dont les taux sont associés à la morbi/mortalité au cours du VIH (Sandler et al., 2011).

Par ailleurs, plusieurs équipes ont montré que des perturbations dans l'homéostasie lymphocytaire T de la muqueuse digestive concouraient à la pathogénie du VIH. En effet, parmi la différenciation lymphocytaire T CD4, outre la différenciation Th1/Th2, les sous populations lymphocytaires Th17 et T régulatrices ont un rôle important, notamment au sein de la muqueuse digestive.

Une déplétion des LT Th17 survient rapidement au cours de l'infection par le VIH (Favre et al., 2009; Kim et al., 2013; Ndhlovu et al., 2008a). Ainsi, dans une étude portant sur 27 patients, Chevalier *et al* ont pu montrer que le ratio Th17 / T régulateurs était corrélé négativement à la fréquence de LT CD8 activés (HLA-DR+/CD38+) et à certains marqueurs d'inflammation systémique, notamment les taux plasmatiques de CD14 soluble et d'IL-1 récepteur α (Chevalier et al., 2013). D'autres équipes ont confirmé le rôle de la balance entre les lymphocytes Th17 et les T régulateurs au niveau de la muqueuse digestive, avec un ratio en défaveur des LT Th17 chez les patients progressseurs ou présentant une forte activité immunitaire (Favre et al., 2009; Ndhlovu et al., 2008a). Cette dysrégulation de l'homéostasie lymphocytaire T CD4 et ce défaut de reconstitution muqueuse persistent sous traitement et sont associés à la persistance d'une translocation microbienne et d'une activation immunitaire importante (Kim et al., 2013; Mavigner et al., 2012). Néanmoins, ces données concernant l'atteinte de la muqueuse digestive chez l'Homme sont limitées par l'absence de prélèvement facilement obtenu lors des temps précoces de l'infection, contrairement au modèle simien. En particulier, il a pu être montré que le modèle macaque Rhesus d'origine Chinoise était probablement plus proche de l'infection chez l'Homme que le modèle

Indien, dont la pathogénie est plus rapide, avec une déplétion de cellules effectrices intestinales plus marquée (Ling et al., 2002).

2.2. Les acteurs de la réponse immune impliqués dans la genèse de l'inflammation

Lors de la rencontre avec un antigène, une fois passées les barrières « physiques » de l'organisme dont les barrières muqueuses, la réponse immunitaire se met en place grâce à la coordination de plusieurs acteurs reconnaissant l'agent pathogène de manière non spécifique, par le biais de « senseurs » universels situés soit à la surface des cellules, soit dans leur cytoplasme. Cette reconnaissance permet la production de molécules antivirales et de cytokines pro-inflammatoires, constituant une des premières étapes dans la cascade de déclenchement de l'activation immune, contribuant à la mise en place de la réponse immunitaire adaptative.

2.2.1. Les acteurs cellulaires de l'immunité innée

Les cellules dendritiques

Les cellules dendritiques (DCs) sont des cellules dérivées de la moëlle osseuse, et constituent une des populations les plus importantes dans la fonction de reconnaissance de l'immunité innée, et d'organisation de la réponse immunitaire adaptative (Banchereau et al., 2000). Il existe des DCs myéloïdes, dérivées des progéniteurs myéloïdes CD34+/CD11c+, dont sont issues les cellules de Langerhans (peau, muqueuses) et les DC interstitielles. De façon intéressante, ces mêmes progéniteurs myéloïdes peuvent également être à l'origine des monocytes (CD11c+CD14+). Par ailleurs, il existe également les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDCs), dont un des

rôles importants est la production d'Interféron de type I (IFN-I) en réponse à la reconnaissance du virus par les senseurs cellulaires (Liu, 2005).

Ces cellules migrent dans les tissus en primo-infection et jouent un rôle pro-inflammatoire très précocement. Au cours de l'infection par le VIH, il a pu ainsi être montré que les cellules dendritiques plasmacytoïdes produisaient de grandes quantités d'IFN de type I en réponse à la stimulation par le virus lui-même, mais également par des virions inactivés (Fonteneau et al., 2004). De même, Herbeuval *et al* ont montré qu'un des mécanismes de déplétion CD4 était l'apoptose médiée par la voie TRAIL-DR5 (Herbeuval et al., 2005a). De même, cette équipe a montré que le ligand de TRAIL, DR5, était surexprimé à la surface des CD4 - mais pas des CD8 - chez les patients infectés par le VIH1 (Herbeuval et al., 2005b). Cette co-expression de TRAIL et DR5 était associée à une apoptose accrue caspase 3-dépendante des LT CD4, et réduite sous traitement ARV efficace (Herbeuval et al., 2005b).

Une dysfonction des cellules dendritiques myéloïdes a également été mise en évidence dès la primo-infection VIH (Huang et al., 2011; Sabado et al., 2010), au profit notamment d'une production accrue de cytokines pro-inflammatoires. Par ailleurs, les cellules folliculaires dendritiques, localisées dans les organes lymphatiques, jouent un rôle dans l'activation lymphocytaire adjacente et la captation prolongée des antigènes, dont les particules virales du VIH (Keele et al., 2008b). Elles constituent également un réservoir du virus. Ainsi, elles pourraient contribuer à maintenir de l'inflammation par une présentation prolongée des particules virales.

Les cellules dendritiques contribuent donc, par la présentation des antigènes, à la production de cytokines proinflammatoires et d'Interféron de type I, à l'activation du système immunitaire et l'engagement de voies d'apoptose.

Les monocytes et macrophages

Les monocytes constituent environ 5% des cellules mononuclées sanguines. Ils sont caractérisés par leur taille, leur granulosité et l'expression de certains marqueurs de surface (**Figure 5**)(Ziegler-Heitbrock et al., 2010). La grande majorité des monocytes circulants (90-95%) expriment à la surface le CD14 (récepteur au LPS) et peu le CD16 (monocytes « classiques »). A l'instar des cellules dendritiques, ils expriment des senseurs cellulaires membranaires ou cytoplasmiques leur permettant de contribuer à la réponse immune.

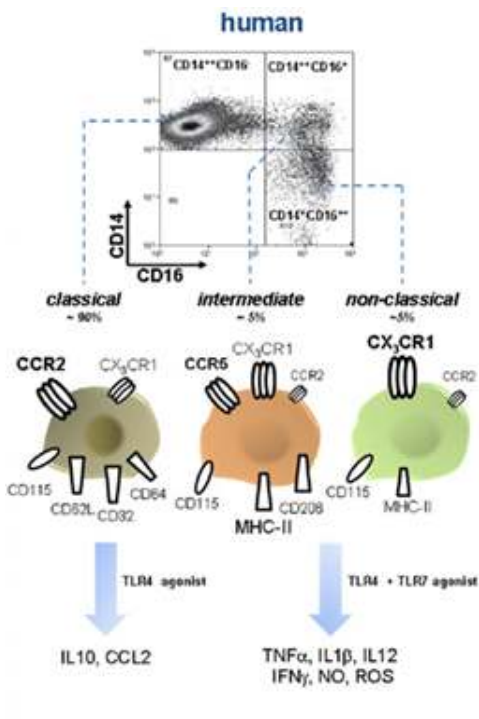


Figure 5. Représentation schématique des trois catégories de monocytes chez l'Homme selon l'expression de leurs marqueurs de surface et leur production de médiateurs. D'après (Zimmermann et al., 2012).

Au cours de l'infection par le VIH, notamment lors des phases de virémie importante et non contrôlée, on constate une augmentation du taux de monocytes circulants CD16⁺ (intermédiaires) et CD16⁺⁺ (« non-classiques ») (Campbell et al., 2014). Ces mêmes monocytes CD14^{-/lo}CD16⁺⁺ peuvent acquérir l'expression de M-DC8 et devenir pro-inflammatoires dans les phases de virémie importante (Dutertre et al., 2012). Il a également été montré que les monocytes participaient à la dysrégulation immunitaire,

en surexprimant certains marqueurs de costimulation comme B7-1/B7-2 (Boasso et al., 2008) ou d'inhibition comme PD-L1 (Boasso et al., 2008; Meier et al., 2008). Enfin, ils sont responsables d'une forte production de certaines cytokines ou chimiokines pro-inflammatoires, comme le $\text{TNF}\alpha$ (Dutertre et al., 2012), l' $\text{IL1}\beta$ (Guo et al., 2014) ou CXCL10 (Simmons et al., 2013). Les monocytes constituent également des cellules intéressantes dans la physiopathologie de la persistance de l'infection, au sens où ils constituent des réservoirs du VIH (Lambotte et al., 2000; Zhu et al., 2002). Cependant, ils sont plus résistants à l'infection productive, de par leur capacité accrue de production de facteurs de restriction des rétrovirus (tels que SAMHD1, APOBEC3G ou viperin).

Les macrophages constituent dans ce cadre un autre compartiment important (Campbell et al., 2014). En effet, ils peuvent correspondre à des macrophages résidents ou bien encore à l'infiltration tissulaire de monocytes se transformant en macrophages. Une caractéristique notable de ces cellules dans le cadre de la pathologie associée au VIH est leur rôle de réservoir, empêchant l'éradication du virus par une efficacité seulement partielle du traitement antirétroviral (Yukl et al., 2014). Ces cellules résidentes peuvent être schématiquement divisées selon leur phénotype M1 ou M2, selon qu'elles sont sensibles à des stimuli pro-inflammatoires ou du LPS (M1) ou à l'IL4, l'IL10 (M2).

Ces cellules jouent un rôle important dans l'entretien de l'inflammation au niveau tissulaire, ainsi que dans la génèse de l'athérosclérose ou du déclin neurodégénératif précoce au cours du VIH (Burdo et al., 2013a; Campbell et al., 2014).

Les cellules « Natural Killer » (NK)

Les cellules NK constituent une autre population cellulaire impliquée dans l'immunité innée anti-infectieuse et anti-tumorale, par des fonctions cytotoxiques et immunorégulatrices importantes. Elles représentent environ 10% des cellules mononuclées sanguines. Ces lymphocytes sont caractérisés par l'absence d'expression du CD3, mais l'expression des marqueurs CD16 et CD56 (Gasser and Raulet, 2006). On distingue deux grandes catégories de lymphocytes NK selon le niveau d'expression de CD56 (Lanier et al., 1986).

Les NK circulants CD56^{dim}CD16^{bright}, sont responsables de la fonction cytotoxique. Elles reconnaissent les cellules par l'interaction entre le soi exprimé à sa surface par le CMH de classe I, et leurs récepteurs naturels inhibiteurs de type « Killer Immunoglobulin-like receptor » (KIR). Une des voies d'activation de ces cellules est le « défaut d'inhibition » de ces KIRs, par diminution de l'expression de l'HLA classe I à la surface des cellules cibles, ou « soi manquant » (« soi modifié ») (Gasser and Raulet, 2006). Une autre voie est l'activation directe par certains récepteurs des NK comme NKG2D ou NKp30/NKp44, en réponse à l'expression de leurs ligands (MICA, MICB, ULBP1-4 ou les NCR-L) par les cellules infectées. La fonction cytotoxique exercée est de deux types : d'une part, une cytotoxicité naturelle « directe » (libération de perforine et de granzyme) et d'autre part, une cytotoxicité cellulaire médiée par les anticorps (ADCC), en réponse à l'engagement du CD16 (FcγRIII) (Gasser and Raulet, 2006; Marras et al., 2014).

Une autre population NK, minoritaire dans le sang circulant (<5%) mais prédominante dans les organes lymphoïdes, est la population CD56^{bright}immunorégulatrice (Lanier et al., 1986). Ces cellules sont très sensibles à la stimulation cytokinique, notamment *via* le

récepteur de haute affinité pour l'IL2 (Caligiuri et al., 1990), et produisent en réponse de grandes quantités de cytokines pro- et anti-inflammatoires telles que l'IFN γ , le TNF α , l'IL10 et l'IL13 (Cooper et al., 2001).

Depuis plusieurs années, les données disponibles concernant la fonction et la caractérisation des NK au cours du VIH sont de plus en plus nombreuses. Ainsi, il a pu être montré que le nombre et la fonction de ces cellules étaient compromis chez les patients en progression (Fauci et al., 2005; Mavilio et al., 2005), en particulier concernant le contingent CD56^{dim} (Alter et al., 2005). Le rôle des NK semble également important dans le contrôle de la réplication virale (Scott-Algara et al., 2008), et la fonction des récepteurs naturels NKp30, NKp44 et NKp46 est altérée chez les patients virémiques, sans réversion complète sous traitement anti-rétroviral efficace (Marras et al., 2013; Mela et al., 2005; Ravet et al., 2007).

L'activation des lymphocytes NK, notamment le contingent cytotoxique, a été récemment montrée comme étant associée à la progression de la maladie et à l'expression de CD14 soluble ou d'IP10 (Kuri-Cervantes et al., 2014), confirmant leur potentiel pro-inflammatoire et lié à l'activation cellulaire globale.

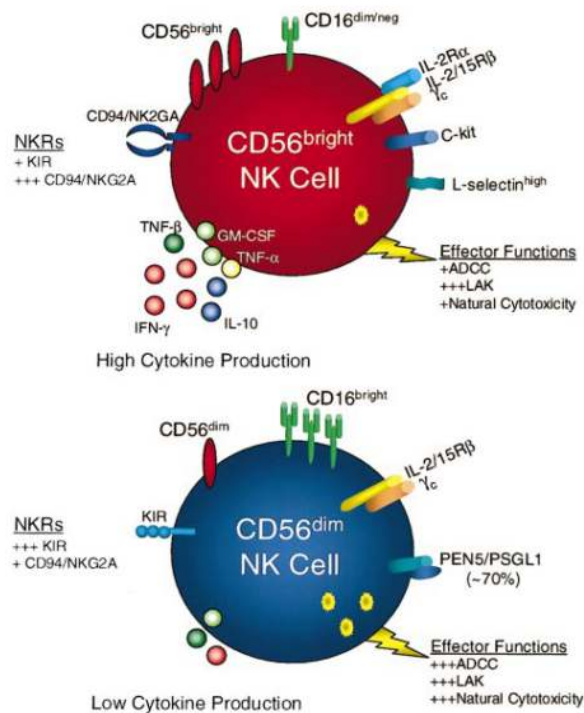


Figure 6. Représentation schématique des cellules NK selon l'expression du marqueur CD56. D'après (Cooper et al., 2001).

Les polynucléaires neutrophiles

Les polynucléaires neutrophiles (PNN) font partie de l'arsenal de l'immunité innée. En particulier, ces cellules jouent un rôle important dans la défense non spécifique anti-bactérienne et anti-fongique. Elles migrent rapidement par des mécanismes de chimiotactisme aux sites infectés, en réponse à un signal d'alarme et à la production de cytokines précoces pro-inflammatoires comme l'IL8, l'IL18 ou le TNF α . Les PNN exercent le rôle défensif par la mise en œuvre d'une phagocytose dépendante des mécanismes d'oxydation et la production de radicaux dérivés de l'oxygène (Borregaard, 2010; Gabelloni et al., 2013).

Après avoir exercé leur fonction, les PNN meurent rapidement. Néanmoins, leur sensibilité aux cytokines pro-inflammatoires ainsi que la présence de produits

microbiens peut entraîner une augmentation de leur durée de vie aboutissant à l'entretien de phénomènes inflammatoires et nécrotiques dérégulés (Gabelloni et al., 2013).

Dans le cadre de la pathologie associée au VIH, la fonction des PNN a longtemps été étudiée dans le cadre de la défense contre les infections bactériennes et fongiques opportunistes. Si le VIH n'infecte pas les PNN, des dysfonctions de ces cellules ont été observées, qu'il s'agisse de défauts fonctionnels de phagocytose ou d'un excès de mort cellulaire de ce contingent (Elbim et al., 1994; Michailidis et al., 2012).

Ainsi, Campillo-Gimenez et al. ont montré que les PNN de patients infectés par le VIH exprimaient plus le CD11b et produisaient plus de radicaux de l'oxygène, témoignant d'un état d'hyeperactivation à l'état basal. Ces résultats étaient en lien avec un environnement cytokinique pro-inflammatoire plus important, notamment la production d'IL18 (Campillo-Gimenez et al., 2014).

L'étude de l'activation des polynucléaires neutrophiles et des liens avec les manifestations inflammatoires chroniques est importante car peu connue au cours de l'infection par le VIH.

2.2.2. Cascade cytokinique au cours de l'infection par le VIH :

rôle des Interférons et génèse de l'inflammation

Dès la primo-infection, une activation forte du système immunitaire se met ainsi en route. Cela se traduit par l'expression cellulaire de marqueurs membranaires d'activation (HLA de classe II, CD38), et également par la synthèse de multiples cytokines, pro- et anti-inflammatoires (**Figure 7**) (Stacey et al., 2009).

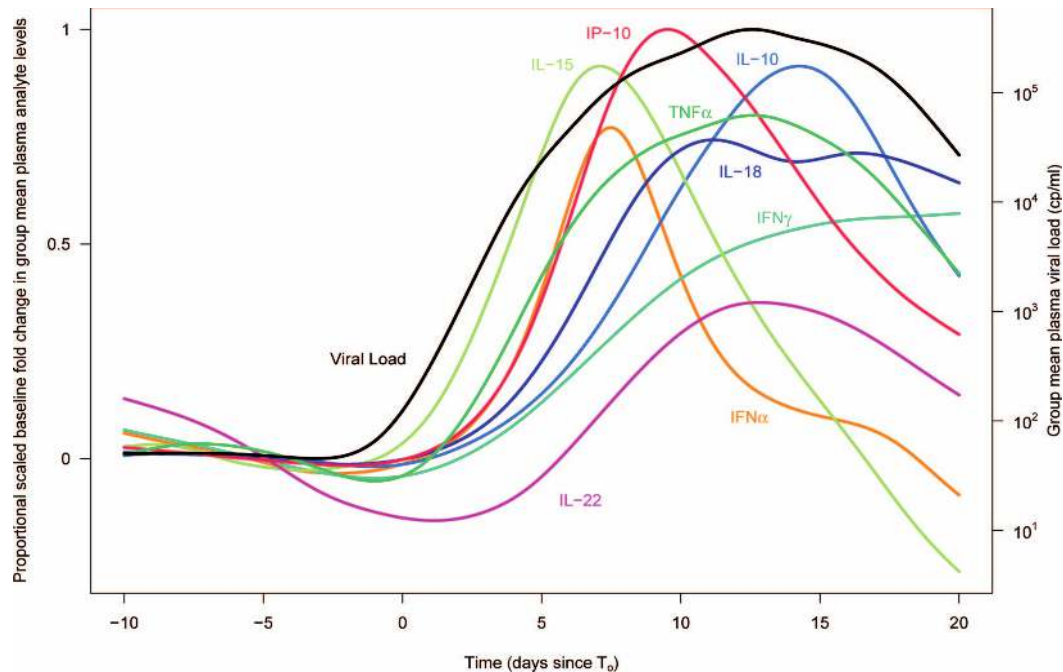


FIG. 5. Scaled proportional group mean change relative to baseline over time in plasma levels of selected analytes in subjects acutely infected with HIV. The proportional change relative to baseline in plasma levels of selected analytes (see key) and the viral load over time in the entire group of HIV-infected subjects are shown. The peak heights for different analytes are scaled according to the percentage of HIV-infected subjects studied who exhibited an elevation in plasma levels of the analyte concerned. Time is plotted in days relative to T_0 , cp, copies.

Figure 7. Cascade cytokinique survenant lors de la primo-infection. En particulier, un pic de production d' $IFN\alpha$, d' $IP10$ et d' $IL15$ est constaté. D'après (Stacey et al., 2009).

Cette cascade cytokinique fait suite à la reconnaissance du virus par des « senseurs », situés à la surface ou dans le cytoplasme des cellules de l'immunité innée : les TLRs (**Figure 8**), les RLRs et les DNA-sensors.

Parmi la multitude de cytokines produites lors de l'infection par le virus du VIH, nous nous focaliserons sur la production d'Interférons de type I, dont le rôle dans la régulation de la défense antiviral et l'activation du système immunitaire est central.

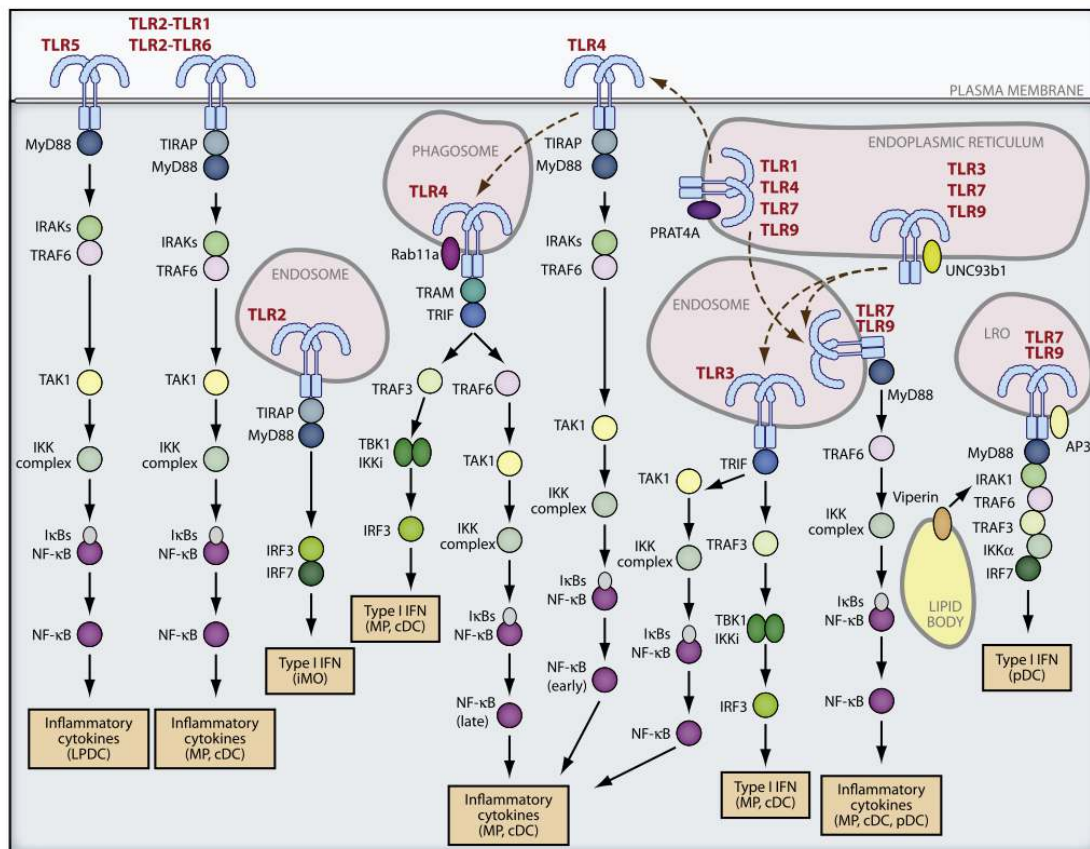


Figure 8. Représentation schématique des voies de reconnaissance des pathogènes par les TLRs, aboutissant au déclenchement de la cascade cytokinique. D'après (Kawai and Akira, 2011).

Le VIH est, comme nous l'avons vu, internalisé par endocytose après interaction entre la gp120/gp41, le CD4 et son co-récepteur CCR5 ou CXCR4 (Weiss, 2003). Après sa pénétration intracellulaire, l'ARN viral va ainsi être reconnu en intra-cytoplasmique par les TLRs endosomaux (TLR3, TLR7/9), ainsi que MDA5 et RIG-I. Les TLRs interagissent avec les protéines d'adaptation MyD88 et TRIF, activant ainsi IRF3 et 7. En parallèle, les RLRs interagissent avec MAVS, permettant de recruter TRAF3, TBK1 et IKKε, ou IKKγ (NEMO), IKKα and IKKβ, conduisant à l'activation et la translocation nucléaire d'IRF3 et

de NF- κ B. IRF3, IRF7 et NF- κ B se lient ensuite au promoteur du gène de l'Interféron pour déclencher sa transcription (Diamond and Farzan, 2013).

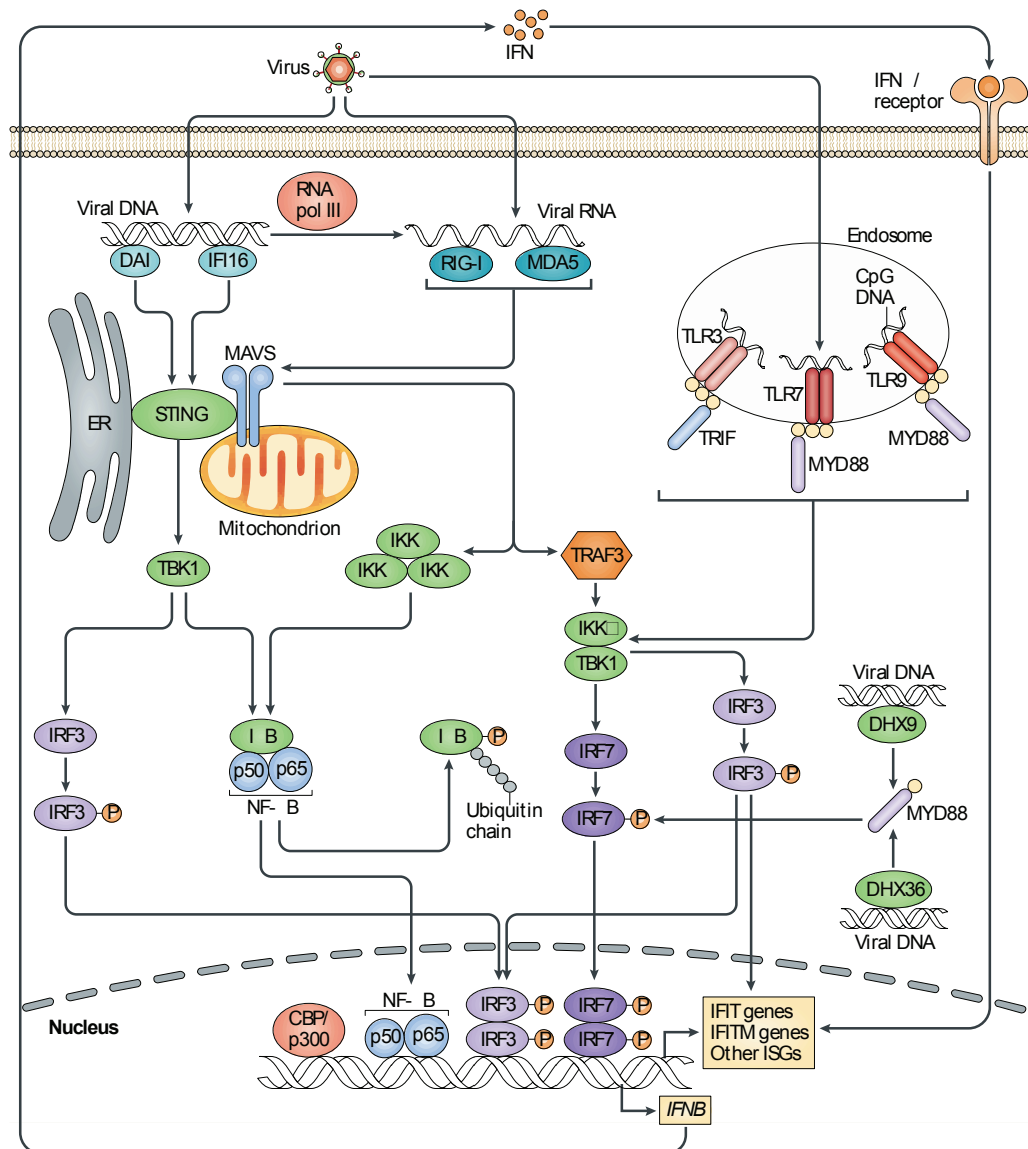


Figure 9. Reconnaissance intracellulaire du virus par les TLRs, RIG-I et MDA5 permettant la synthèse d'Interféron de type I et de gènes dépendant de l'Interféron. D'après (Diamond and Farzan, 2013)

Par la suite, deux vagues de production d'Interférons ont été décrites, dépendant du mode de signalisation des senseurs cellulaires (membranaires ou cytoplasmiques), et de la disponibilité des facteurs d'aval, comme les IRFs. Ainsi, alors que RIG-I et de MDA5 sont retrouvés dans un nombre important de cellules, l'expression de TLR3 et 4 est préférentielle au sein des DCs et des monocytes/macrophages, tandis que celle de TLR7 et 9 est restreinte aux pDCs (Honda and Taniguchi, 2006). Après leur activation, la cascade de voies de signalisation entraîne deux voies essentielles de production des Interférons de type I : la voie d'IRF3 et celle d'IRF7 (Honda and Taniguchi, 2006).

IRF7 est présent de manière constitutive en faible taux dans de nombreux sous-types cellulaires, mais est inductible, tandis qu'IRF3 est disponible en quantités plus importantes. Autrement dit, la première vague de production d'Interféron en réponse à l'engagement des différents senseurs dépend essentiellement d'homodimères IRF3/IRF3 ou d'hétérodimères IRF3/IRF7. Ils sont responsables de la production d'IFN β et de quelques sous-types d'IFN α . Par voie autocrine et paracrine, ces sous-types d'IFN de type I induisent l'expression d'IRF7 aboutissant à des homodimères IRF7/IRF7 permettant la production dans une deuxième vague des autres sous-types d'IFN α (Sato et al., 2000).

Lors de la primo-infection par le VIH, il a ainsi pu être observé que de fortes quantités d'Interféron de type I étaient produites, avec un pic de production autour de J6, concomitant d'une cascade cytokinique pro-inflammatoire importante et précédant le pic de la charge virale plasmatique (Stacey et al., 2009). Fait important, cette production n'est plus détectable dans le plasma dans des délais assez rapides, quelques semaines à quelques mois après l'infection (Kamga et al., 2005; Killian et al., 2006), mais reste

déTECTABLE au niveau tissulaire (Lehmann et al., 2010; Nascimbeni et al., 2009). Elle est à nouveau détectable dans le plasma de manière disparate lors de phases tardives de l'infection (Hardy et al., 2013; Stylianou et al., 2000; von Sydow et al., 1991).

L'activité antivirale des Interférons de type I est très importante, et se situe à de multiples niveaux. Notamment, il a été très rapidement montré que l'adjonction d'IFN pouvait *in vitro* inhiber la réplication virale sur cellules de lignées (Bednarik et al., 1989; Poli et al., 1989; Smith et al., 1991), conduisant à des essais cliniques chez les patients infectés (Fernández-Cruz et al., 1995; Lane et al., 1990; Skillman et al., 1996), offrant des résultats contrastés. Lors de l'essai INTERPRIM par exemple, l'adjonction ou non d'IFN α 2b à des patients en primo-infection inclus dans un protocole d'arrêt standardisé de traitement ne montrait pas de différences en termes de charge virale VIH ou de taux de LT CD4 (Goujard et al., 2012). Cependant, les effets *in vitro* de cette stratégie, notamment concernant l'activation de la réponse humorale, semblaient importants (Adalid-Peralta et al., 2008). En outre, il a été constaté que les IFN-I activaient la réponse immune spécifique (Hardy et al., 2009, 2013).

Néanmoins, il semble que cette activité antivirale anti-VIH se perde au cours du temps, par différents mécanismes. Ainsi, les cellules dendritiques plasmacytoïdes circulantes des patients virémiques progressseurs deviennent réfractaires à la restimulation par le VIH (Barblu et al., 2012). Plus encore, il a pu être montré que les autres acteurs de coordination de la réponse immune, notamment les monocytes, devenaient réfractaires à la stimulation par l'IFN-I, notamment du fait d'une « désensibilisation » par une downrégulation de l'IFNAR (Hardy et al., 2009). Une limite à ces études est qu'elles sont

effectuées sur les cellules sanguines. Il n'est pas exclu que la régulation de l'activité antivirale de ces cellules dans le microenvironnement lymphoïde soit différente.

Enfin, l'activation de la voie des IFN de type I est également à double tranchant sur le long terme. En effet, les voies immunorégulatrices déclenchées par les IFN-I sont adaptées aux réponses anti-virales de courte durée, et ont pour objectif l'élimination des cellules cibles et des cellules activées. Or, dans le cadre de l'infection chronique par le VIH, certains effets liés à l'IFN-I produit au long cours sont impliqués dans la déplétion lymphocytaire T CD4. Notamment, la voie d'apoptose médiée par TRAIL-DR5 (Herbeuval et al., 2005a, 2005b, 2005c), ainsi que la voie Fas-FasL (Kaser et al., 1999) ont été largement caractérisées. Par ailleurs, les IFN-I induisent l'expression de molécules d'immunorégulation visant à générer des réponses T-régulatrices, comme l'indoleamine-2,3-dioxygénase (IDO), qui pourraient contribuer à l'altération des barrières muqueuses par le défaut de ratio Th17/Treg dans le système digestif (Favre et al., 2009; Malleret et al., 2008) et entretenir l'activation immunitaire.

Les Interférons de type I jouent ainsi un rôle crucial dans le déclenchement de la réponse immune anti-VIH.

2.2.3. Gènes induits par l'interféron

Plusieurs équipes s'accordent sur le fait que le dosage des IFN-I est difficile et peu lié à leur activité selon les stades de l'infection. En effet, cette cytokine peut être produite dans des quantités inférieures aux seuils habituellement utilisés dans nos laboratoires, et est produite au sein des organes lymphoïdes plutôt qu'en périphérie (Harris et al., 2010; Jacquelin et al., 2009). Cet ensemble a conduit à utiliser les gènes dépendants de

l'IFN (ISGs) comme des reflets de sa production et de sa fonction (Sadler and Williams, 2008).

La liaison de l'IFN de type I à son récepteur IFNAR (**Figure 10**) active la voie de signalisation JAK/STAT. Les deux kinases JAK1 et TYK2 sont activées et vont phosphoryler les facteurs cytoplasmiques STAT1 et STAT2, qui s'assemblent ensuite au facteur IRF-9 pour former le facteur de transcription ISGF3 (IFN Stimulated Genes factor 3). Après translocation nucléaire, ISGF3 se fixe à son promoteur ISRE (IFN Stimulated Response Elements) qui active la transcription de nombreux gènes, les IFN Stimulated Genes (ISGs)(Ivashkiv and Donlin, 2014; Levy et al., 2011; Sadler and Williams, 2008).

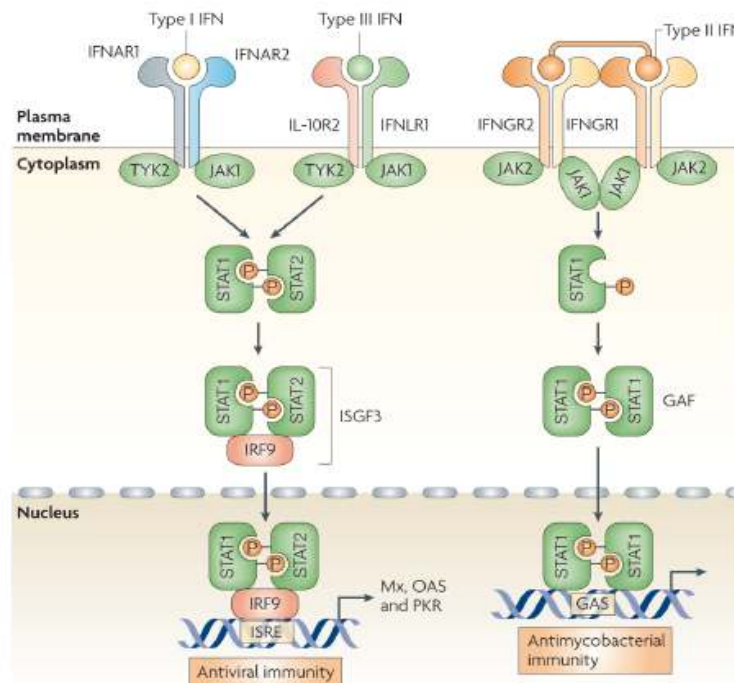


Figure 10. Voies de signalisation des Interférons de type I, II et III après leur liaison à leur récepteur. D'après (Sadler and Williams, 2008)

A ce jour, plus de 500 ISGs ont été décrits. Ils codent pour des protéines ayant une activité antivirale par de multiples mécanismes, ou jouant un rôle dans la régulation de

la réponse immune (Sadler and Williams, 2008). L'IFN de type I est le principal inducteur d'ISGs, et certains ISGs comme *mxA* ou *pkr* sont induits quasiment exclusivement par l'IFN α . Cependant, les IFNs de type II et III sont également capables d'induire un état antiviral via la production d'ISGs, et certains ISGs tel *ip10* ou *ifitm1* peuvent être induits par les IFN α et γ (Stylianou et al., 2000). Enfin quelques ISGs (CXCL9) s'avèrent être plus spécifiques d'une réponse médiée par l'IFN γ (Liu et al., 2012)

La régulation de l'expression des ISGs est complexe. Ainsi, il a été décrit une boucle autocrine d'auto-amplification permettant une réponse IFN notamment antivirale rapide et forte, mettant en jeu des ISGs telles que STAT1 ou IRF9. Il en est de même pour la régulation négative qui fait intervenir les protéines SOCS (Suppressors of cytokine signalling), notamment SOCS1 et SOCS3, elles mêmes induites par la voie IFN/JAK/STAT dans une boucle de rétrocontrôle négatif (Ivashkiv and Donlin, 2014; Schneider et al., 2014). Il est également à noter que l'âge, le sexe, l'ethnie, le tabac et l'alcool pourraient moduler l'expression d'ISGs par des mécanismes incomplètement élucidés (Chang et al., 2013; Pahar et al., 2013; Petro et al., 2002; Redd et al., 2009). Enfin, il est important de souligner que ces « ISGs » peuvent également être transcrits par d'autres voies indépendantes de l'Interféron, en particulier par une voie directe des TLRs sur leur promoteur (Harman et al., 2011).

L'implication des ISGs dans la pathogénie du VIH est vaste et se retrouve à différents niveaux. Ainsi, les protéines codées par ces gènes peuvent avoir une action antivirale directe, par divers mécanismes bloquant la réplication virale (**Figure 11**). Il s'agit de facteurs de restriction, dont certains ont été précisément décrits ces dernières années

comme APOBEC-3G (Mangeat et al., 2003), TRIM5 α (Sayah et al., 2004), BST-2 (Tetherin) (Neil et al., 2008), SAMHD1 (Laguette et al., 2011) ou Mx2 (Goujon et al., 2013).

D'autres gènes codent pour des protéines impliquées dans l'immunomodulation : rôle de maturation cellulaire, action proliférative, activation cellulaire et induction de CD38, costimulation (Sadler and Williams, 2008)... Certaines cytokines/chimiokines pro-inflammatoires font partie des gènes induits par les Interférons, comme la chimiokine CXCL10 (IP10), dont les taux ont été montrés associés au risque de progression de la maladie liée au VIH (Liovat et al., 2012; Noel et al., 2014; Stylianou et al., 2000).

Enfin, certains gènes décrits ci-dessus sont impliqués dans les mécanismes pro- ou anti-apoptotiques, tels que TRAIL (Herbeuval et al., 2005c).

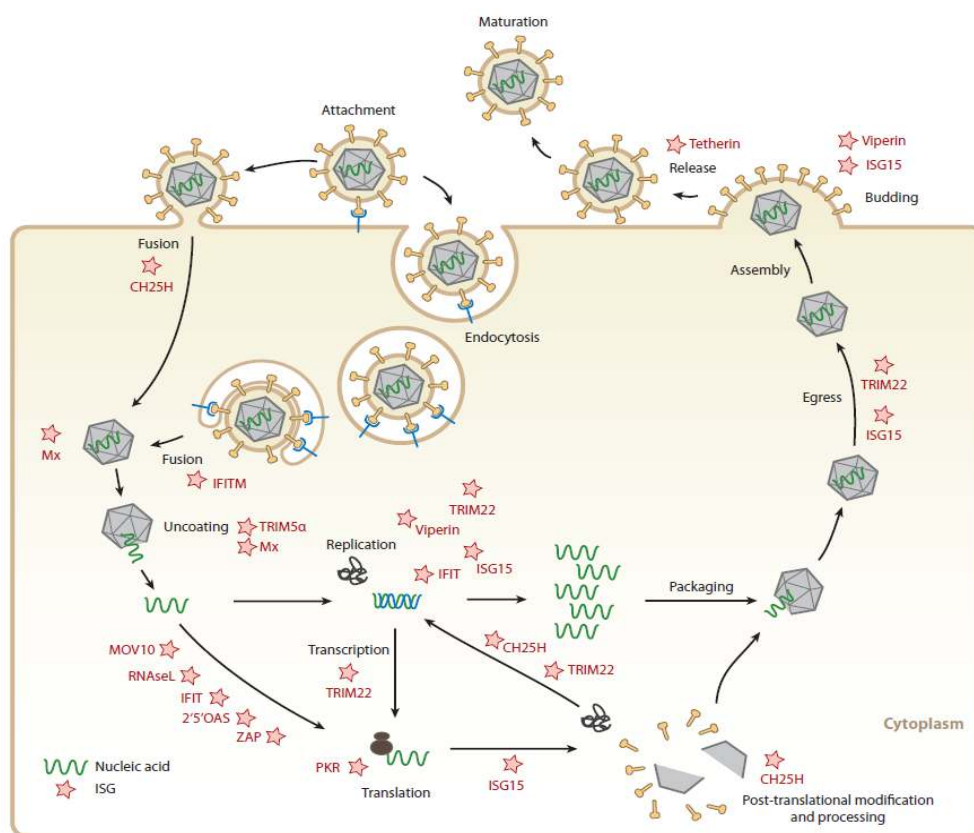


Figure 11. Cibles virales distinctes de différents ISGs. D'après (Schneider et al., 2014)

La signature IFN, traduite par l'expression des ISGs par certaines cellules au cours de l'infection par le VIH, varie en fonction du stade de l'infection et du niveau de charge virale. Chez les patients virémiques non traités, il existe une corrélation entre le taux élevé d'ISGs et la progression de la maladie (Herbeuval and Shearer, 2007). Ainsi, des études de transcriptomique ont montré la forte expression de nombreux ISGs par les LT CD4 de patients virémiques non traités comparés à des LT CD4 de donneurs sains (Sedaghat et al., 2008). En phase aiguë, un taux élevé d'IP10 (interferon-inducible protein 10 ou CXCL10) est associé à une progression plus rapide de l'infection par le VIH (Liovat et al., 2012). En phase chronique, chez des patients non traités (Hardy et al., 2013; Rotger et al., 2010; Sedaghat et al., 2008), il existe une augmentation du taux d'IFN-I et de l'expression des ISGs au sein des LT CD4 et CD8 activés circulants et au sein des ganglions. Ces anomalies sont corrélées à une immunosuppression plus importante, une activation accrue des LT CD4 et T CD8 et une charge virale (CV) plus élevée.

Chez les patients sous ARV efficace, il existe une corrélation entre une mauvaise restauration immunitaire sous traitement et un taux élevé de certains ISGs (IFI6, ISG56/IFIT1, IFI27) au sein des LT CD4 (Fernandez et al., 2011). La production d'ISG reste probablement plus élevée chez les patients avirémiques sous ARV que chez les donneurs sains (Krishnan et al., 2014). Ainsi au cours de l'infection par le VIH il existe une forte expression des ISGs par les LT CD4 et CD8. Cette signature interféron s'atténuerait sous traitement antiretroviral ARV mais resterait associée à une activation immunitaire importante avec ses conséquences au long cours (Herbeuval and Shearer, 2007).

En résumé, une cascade cytokinique, dont les Interférons de type I et les ISGs sont des acteurs majeurs, est initiée très tôt après l'infection et conduit à l'activation du système immunitaire adaptatif.

2.3. Réponse immunitaire adaptative et activation lymphocytaire

2.3.1. Réponse lymphocytaire T CD8

Lors de la réponse immune antivirale, les lymphocytes T CD8 ont un rôle majeur (**Figure 12**). En effet, leurs fonctions incluent la lyse antigène-spécifique des cellules cibles, selon une reconnaissance restreinte par le CMH de classe I, *via* la sécrétion de molécules cytolytiques (perforine, granzyme), la production de cytokines (IFN γ , TNF α , IL2) ou de chimiokines telles que MIP-1 α et RANTES.

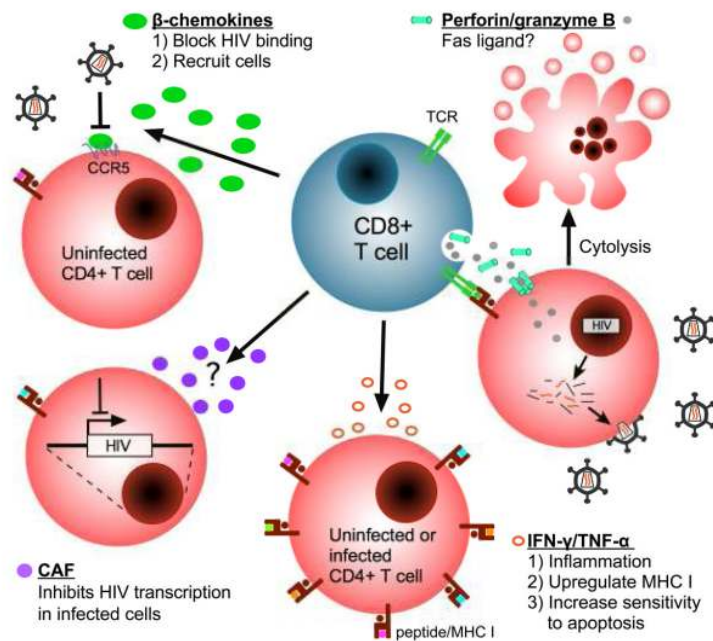


Figure 12. Actions cytotoxiques, inhibitrices du VIH et pro-inflammatoires des LT CD8 au cours de l'infection par le VIH.

Dans le cadre de la pathologie liée au VIH, plusieurs arguments indiquent que les LT CD8 jouent un rôle important dans le contrôle antiviral. Très tôt au cours de la primo-infection, des LT CD8 spécifiques sont générés (Gea-Banacloche et al., 2000; Jagannathan et al., 2009). Ainsi, la résolution du pic de réplication virale en fin de primo infection est associée à l'expansion de LT CD8 spécifiques du VIH. Dans le même sens, des manipulations de déplétion T CD8 ont montré une augmentation drastique de la réplication virale dans des modèles simiens (Gaufin et al., 2010). En parallèle, plusieurs études ont montré que la réplication virale était soumise à une pression de sélection exercée par les CD8, conduisant à la sélection de mutations dans des gènes viraux induisant une diminution de la capacité répliquative du VIH. Enfin, une association entre certains allèles de classe I (HLA-B27, HLA-B57) et un meilleur contrôle de la réplication virale est connu de longue date (Migueles et al., 2000, 2003).

La fonctionnalité de ces cellules peut être évaluée par leur capacité de dégranulation de la perforine, ainsi que la production d'IL2, IFN γ , TNF α , MIP1 β et CD107a. Il a pu être montré que la dégranulation rapide de perforine et que la présence de T CD8 spécifiques polyfonctionnels dans le sang périphérique étaient associés au contrôle de la virémie chez les patients HIV controllers (Hersperger et al., 2010; Migueles et al., 2008), parallèlement à une forte avidité des réponses T CD8 (Price et al., 2005), en partie dépendante du maintien d'une exposition à l'antigène (Betts et al., 2004; Janbazian et al., 2012; Kløverpris et al., 2014). Le maintien des réponses T CD8 spécifiques est associé à un contrôle antiviral au long cours (Betts et al., 2006).

Ces fonctions des LT CD8 sont associées à une activation de ce contingent cellulaire, survenant très tôt au cours de l'infection et persistant sous traitement (Betts et al., 2004;

Carabasi et al., 1991; Catalfamo et al., 2011; Cossarizza et al., 1995; Lécurox et al., 2009a; Ndhlovu et al., 2008b; Paiardini and Müller-Trutwin, 2013). Ainsi, cette activation forte et durable, en lien partiel avec la réplication virale, est un marqueur pathogénique majeur de l'infection par le VIH. C'est un élément fondamental de prédiction de la progression, indépendamment de la charge virale (Deeks et al., 2004; Giorgi et al., 1999). En effet, cette activation T CD8 chronique a des conséquences néfastes sur la fonction de ces cellules. Ainsi, on observe une altération progressive des réponses CD8 au cours de la pathologie associée au VIH. Brenchley *et al* ont montré que, en périphérie, les cellules T CD8 spécifiques du VIH présentaient un défaut de leurs capacités prolifératives en réponse à la stimulation, en lien avec l'expression de CD57, un marqueur de sénescence (Brenchley et al., 2003). L'activité cytotoxique dans les organes semble cependant être conservée, y compris chez les patients virémiques (Hosmalin et al., 2001). Ces cellules sont également plus sensibles à la mort programmée, par l'expression de PD1 (Day et al., 2006; Kløverpris et al., 2014). De même, une accélération de l'immunosénescence a été établie (Sauce et al., 2011). Au sein du laboratoire, notre équipe a également pu mettre en évidence que lors de la primo-infection, l'expression de CD127 (IL7R) était inversement corrélée à la charge virale et à l'activation des LT CD8 spécifiques (acquisition du marqueur CD38). Cette expression était rétablie avec l'instauration précoce d'un traitement ARV et conférait aux LT CD8 spécifiques une meilleure capacité proliférative en réponse à l'IL7 (Lécurox et al., 2009b). Enfin, le rôle de facteurs de transcription impliqués dans la différenciation lymphocytaire semble important. Il a ainsi pu être montré que la régulation de l'expression de T-bet et d'EOMES était importante dans la différenciation des LT CD8 en cellules effectrices, et que celle-ci était perturbée au cours de l'infection par le VIH (Buggert et al., 2014; Simonetta et al., 2014).

En résumé, le rôle des LT CD8 dans le contrôle antiviral est un élément très important dans la physiopathologie de l'infection par le VIH. Néanmoins, l'activation prolongée des LT CD8 est néfaste à long terme sur leurs fonctions.

2.3.2. Réponse lymphocytaire T CD4

La fonction lymphocytaire T CD4 est également importante dans la pathogénie de l'infection par le VIH. Ces lymphocytes constituent en effet une cible privilégiée d'entrée du virus, et leur déclin au cours du temps est une caractéristique fondamentale de la pathogénie du VIH.

Chez les patients progressifs, l'infection par le VIH provoque, dès la primo-infection, un défaut quantitatif et qualitatif des LT CD4, notamment des LT CD4 mémoires centraux. Il a pu être montré que les LT CD4 spécifiques du VIH sont préférentiellement infectés par le virus *in vivo*, quel que soit le stade de l'infection (Demoustier et al., 2002; Douek et al., 2002). Ces constats expliquent, entre autres, l'inefficacité de la réponse antivirale en primo-infection. Ceci contribue à l'élimination progressive des LT CD4 spécifiques du VIH, et fragilise de manière croissante les défenses antivirales, puisqu'à chaque stimulation antigénique, les T CD4 spécifiques sont à nouveau des cibles de l'infection. En outre, il a été montré dans les modèles simiens comme humains que le contingent lymphocytaire T CD4 mémoire central est le plus altéré, en périphérie comme dans les organes lymphoïdes (Mattapallil et al., 2005), et n'est que peu rétabli sous traitement (Elrefaei et al., 2004).

En particulier, ces cellules perdent leurs capacités de prolifération en réponse aux antigènes viraux (Lichterfeld et al., 2004), et de production de cytokines telles que l'IL2 (Younes et al., 2003). Seule la population de LT CD4 producteurs d'IFN γ persiste. Cet ensemble d'anomalies des lymphocytes T « helper » explique en partie le défaut de mise en place d'une réponse immunitaire efficace précoce chez les patients progressifs.

Par ailleurs, une activation importante des LT CD4, en lien avec la charge virale et associée à l'inflammation, a été montrée au cours du VIH (Catalfamo et al., 2011). Dans ce contexte, des défauts d'homéostasie lymphocytaire, mettant en jeu des défauts de réponse à l'IL7 ainsi que la sénescence cellulaire, jouent un rôle important. Notamment, la répartition, ainsi que les capacités prolifératives des LT effecteurs mémoires, centraux mémoires et naïfs est déséquilibrée au cours de l'infection, les lymphocytes T centraux mémoires étant peu renouvelés et les LT CD4 naïfs ayant de plus faibles capacités prolifératives en réponse à l'infection (Srinivasula et al., 2011).

En outre, l'environnement inflammatoire a un impact sur la fonctionnalité des LT CD4. Ainsi, Shive et al. (Shive et al., 2014) montrent que la présence de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL1 β ou l'IL6 induit une diminution de l'expression membranaire de CD127, et donc une réduction des capacités de réponse à l'IL7.

Enfin, il a été montré que le VIH induit une réduction des capacités de prolifération lymphocytaire T intrathymique, qui ne sont que partiellement améliorées par le traitement antirétroviral (Dion et al., 2004; Douek et al., 1998). Ces capacités de renouvellement thymique altérées au cours du VIH, en lien avec les paramètres d'activation immunitaire, contribuent au déclin du taux de LT CD4 circulants.

Ainsi, une activation anormale et des altérations du compartiment lymphocytaire T CD4 survient au cours du VIH, entraînant une baisse de ces lymphocytes au cours du temps.

2.3.3. Réponse lymphocytaire B et immunité humorale

Outre l'activation lymphocytaire T, les lymphocytes B sont activés au cours de l'infection par le VIH et leur homéostasie est perturbée. En effet, dès la primo-infection, plusieurs marqueurs de cette activation B sont détectés (Amu et al., 2013). Une hypergammaglobulinémie polyclonale est présente précocément, et pourrait être en lien avec l'accumulation de TFH intra-ganglionnaires (Lindqvist et al., 2012). Ces cellules par leur capacité à produire l'IL21 et l'IL10, favorisent le maintien de LB de faible affinité et diminuent leur différenciation en LB mémoires. Par ailleurs, les LB des patients infectés ont une moindre capacité à proliférer et à produire des IgG en réponse à la stimulation *ex vivo* (Jacobson et al., 1991; Moir et al., 2001).

Au cours de l'infection par le VIH, des anticorps anti-VIH apparaissent rapidement, ont pour but de bloquer la propagation virale et sont impliqués dans la réponse immune (réponse NK, ADCC). Les lymphocytes B produisent des anticorps qui, en majorité, ne bloquent pas efficacement le virus. Ces anticorps peuvent être dirigés contre divers antigènes viraux, les épitopes d'intérêt les plus étudiés se situant sur la protéine d'enveloppe (*env*), au niveau de la gp120, de la gp41 et du CD4bs (Deeks et al., 2006; Li et al., 2007). Néanmoins, il existe des anticorps largement neutralisants dont l'intérêt dans le développement de stratégies vaccinales est important. En outre, le rôle des Ac non neutralisants est également important par les mécanismes d'ADCC.

Enfin, au plan phénotypique, on note

- (i) une expansion des LB transitionnels CD19+CD21^{high}CD27-, possiblement liée au niveau de chimiokines et d'IL7 produits dans les sites infectés (Zeng et al., 2011). Ces LB sont caractérisés par une moindre réponse à la stimulation antigénique.
- (ii) une réduction de la proportion de LB mémoires CD21+CD27+(Titanji et al., 2006), du fait d'une susceptibilité accrue à l'apoptose (van Grevenynghe et al., 2011; Rethi et al., 2013), de la maturation prépondérante des LB en plasmocytes sous l'effet de l'IL6, et des défauts d'homéostasie lymphocytaire B liés à la perturbation du milieu cytokinique, lui même dépendant des altérations lymphocytaires T (Cagigi et al., 2008; Rethi et al., 2013). Ainsi, les niveaux d'anticorps vaccinaux d'isotype IgG sont réduits chez les patients infectés au long cours (Pensieroso et al., 2009; Titanji et al., 2006).
- (iii) une surreprésentation de LB activés, perdant l'expression du CD21 (Moir et al., 2001) et gagnant l'expression de marqueurs d'épuisement tels que PD1, ou de récepteurs inhibiteurs comme Siglec-6 ou FCLR4 (Day et al., 2006; Kardava et al., 2011)
- (iv) une diminution de l'expression des molécules de costimulation sur les LB, réduisant l'efficacité des coopérations T-B (Legendre et al., 1998; Samuelsson et al., 1997)

II. Inflammation systémique au cours de l'infection par le VIH

Comme nous l'avons décrit, l'avènement des thérapies antirétrovirales a marqué une modification majeure dans l'évolution de la pathologie liée au VIH. En effet, grâce à ces traitements et au contrôle associé de la charge virale, la durée de vie, ainsi que sa qualité, s'est vue nettement améliorée (Maartens et al., 2014). Néanmoins, la guérison sans traitement et l'éradication du virus ne sont, en 2014, pas encore réalisables.

Dans ce contexte de patients infectés chroniquement et prenant des traitements au très long cours, le constat suivant a été effectué : ces patients présentent des complications « indirectement » liées au VIH, avec une morbidité voire une mortalité non plus associées aux infections opportunistes ou aux cancers classant SIDA, mais à l'athérosclérose précoce, au risque coronarien, à des altérations neurocognitives accélérées, à des cancers non classant SIDA, etc... (Morlat et al., 2014)

Ces pathologies, lorsqu'elles surviennent précocément, sont également observées dans d'autres situations mettant en jeu une activation forte et durable du système immunitaire, et où un lien avec une inflammation systémique à bas bruit a été mise en évidence, comme les maladies autoimmunes (Erkan et al., 2014; Gottenberg et al., 2006; Hirata et al., 2013; Munroe et al., 2014).

1. Constat d'une inflammation exagérée lors de l'infection par le VIH : poids de l'IL6, de la CRP et des D-Dimères

Comme nous l'avons vu, une activation forte du système immunitaire se met en route dès la primo-infection afin de faire face à l'infection, aboutissant à la production de multiples cytokines, pro- et anti-inflammatoires (Stacey et al., 2009).

Ce statut pro-inflammatoire dure dans le temps, avec des conséquences propres délétères sur la morbi-mortalité associée au VIH. Deux tournants importants dans l'appréciation des facteurs associés à une amélioration de la durée et de la qualité de vie au cours de l'infection par le VIH ont eu lieu ces dernières années. Dans un premier temps, l'étude SMART – Strategies for Management of AntiRetroviral Therapy - avait permis de montrer que, chez des patients infectés avec un taux de CD4 maintenu > 350/mm³, la stratégie d'arrêt programmé de traitement était délétère car les LT CD4 baissaient rapidement en dessous de 200/mm³ (El-Sadr et al., 2006), permettant d'établir l'idée que la maintien d'une charge virale strictement indétectable sous traitement, associée au fait de débiter les ARV le plus tôt possible, étaient indispensables (Hoen et al., 2014). Parallèlement, les études dérivées de SMART étaient planifiées pour doser des biomarqueurs solubles reflétant l'inflammation (C-reactive protein, IL6, serum amyloid A protein...) ou l'activation de la voie de la coagulation (D-Dimères), avec le dessein de faire un lien entre la morbidité cardiovasculaire constatée au cours du VIH (Baker and Duprez, 2010) et un état pro-inflammatoire chronique.

Ainsi, il a pu être montré à partir des plasmas des patients inclus dans SMART, que les taux de CRP et d'IL6, ainsi que les D-Dimères, étaient élevés (Kuller et al., 2008; Rodger et al., 2009) et représentaient des biomarqueurs de risque d'infections opportunistes et de progression, indépendamment de la charge virale ou du taux de CD4.

De même, les résultats de l'étude FIRST – Flexible Initial Retrovirus Suppressive Therapies (Boulware et al., 2011) - montrent que des taux élevés d'IL6 et de CRP à l'initiation du traitement anti-rétroviral sont des prédictors indépendants de survenue d'infection opportuniste à 1 an ou de mortalité au long cours. Ces marqueurs ont été

validés comme prédicteurs de mortalité cardiovasculaire à très grande échelle sur une étude portant sur 9764 patients infectés par le VIH (Nordell et al., 2014).

Le rôle de la réplication virale a été initialement évoqué pour expliquer cette inflammation chez les patients virémiques, et plusieurs équipes ont mesuré l'évolution de ces biomarqueurs sous traitement, ainsi que les liens avec la morbi/mortalité toute cause. De manière intéressante, il a pu être montré que ces marqueurs d'inflammation restaient plus élevés chez les patients infectés et traités sur le long terme, que chez les sujets sains (French et al., 2009; Kamat et al., 2012), suggérant que d'autres facteurs que le virus lui-même entraient en ligne de compte pour expliquer cette inflammation.

Néanmoins, l'étude des paramètres tels que l'IL6 et la CRP trouve une limite dans le fait qu'ils sont associés à toutes les causes d'inflammation, et ne peuvent être associés à des mécanismes physiopathologiques précis que de manière limitée. De ce fait, l'étude de « signatures » de biomarqueurs d'inflammation/d'immunorégulation est devenue importante afin de déterminer les mécanismes sous-tendant la genèse de cette inflammation, ainsi que des profils associés à certaines causes précises de morbi/mortalité au cours du VIH (i.e., déclin neurocognitif précoce, maladies cardiovasculaires, risque de syndrome de reconstitution immunitaire, etc...) ou à la progression de la maladie (set point viral, risque de baisse des LT CD4...).

2. Autres biomarqueurs d'inflammation et d'activation immunitaire

Ainsi, outre l'IL6, la CRP ultra-sensible ou les D-Dimères, plusieurs biomarqueurs ont été étudiés au cours du VIH, de manière à refléter plusieurs mécanismes d'activation immune. Ils peuvent être découpés en marqueurs solubles et marqueurs d'activation cellulaire.

2.1. Marqueurs solubles

Il s'agit des cytokines pro- et anti-inflammatoires, des CC et CXC chimiokines, des facteurs d'activation de la voie de la coagulation, des marqueurs membranaires clivés, ou encore des marqueurs d'adhésion cellulaire (**Tableau 1**).

| Tableau 1. Principaux biomarqueurs utilisés ces dernières années dans l'étude des patients infectés par le VIH | | | |
|---|---|------------------------------|---|
| Biomarqueur | Reflet | Effet des TARV | Associations |
| D-Dimères | Activation des voies de la coagulation | Réduction sans normalisation | Mordi/mortalité, risque cardiovasculaire |
| CRP ultrasensible | Inflammation systémique | Elevation persistante | Mordi/mortalité, risque cardiovasculaire, réplication virale, baisse des LT CD4 |
| IL6 | Inflammation systémique | Réduction sans normalisation | Mordi/mortalité, risque cardiovasculaire, réplication virale, baisse des LT CD4 |
| IP10 | Activation des IFN type I et II, activation monocytaire | Réduction? | Réplication virale importante, baisse des LT CD4 |
| MCP1 | Activation des IFN type I et II, activation monocytaire | Réduction? | Risque cardiovasculaire, vieillissement neurocognitif |
| CD14 soluble | Activation monocytaire | Réduction sans normalisation | Mortalité, risque cardiovasculaire, vieillissement neurocognitif |
| CD163 soluble | Activation monocytaire/macrophagique | Réduction sans normalisation | Risque cardiovasculaire, vieillissement neurocognitif |
| TNF, TNF récepteurs solubles | Inflammation systémique | Réduction sans normalisation | Mortalité, baisse des LT CD4 |
| LPS, LBP, EndocAb | Translocation microbienne | Réduction sans normalisation | Réplication virale importante, baisse des LT CD4 |

Ainsi, outre l'IL6 et la CRPus décrits ci-dessus, il a pu être montré que le soluble tumor necrosis factor receptor-1 (sTNFR-1), un marqueur d'engagement de la voie du récepteur au TNF, ainsi que le CD27 soluble (sCD27) ou le ligand soluble de CD40

(sCD40L), deux marqueurs d'activation cellulaire T, étaient également associés au risque d'infections opportunistes ou de décès chez les patients progressifs (Kalayjian et al., 2010).

Parmi les chimiokines, plusieurs études ont confirmé le poids des ligands de CXCR3, un récepteur exprimé à la surface de cellules activées, dans l'inflammation précoce au cours du VIH. Ces ligands sont au nombre de trois : CXCL9 (MIG), CXCL10 (IP10) et CXCL11 (I-TAC) (Clark-Lewis et al., 2003). Ces CXC-chimiokines sont produites précocement dans les sites infectés (ganglions lymphoïdes, muqueuses) au cours de la primo-infection (Liovat et al., 2012; Stacey et al., 2009) et permettent d'attirer les lymphocytes activés CXCR3+ (Liu et al., 2011). En particulier, la protéine IP10 (IFN inducible protein 10), produite sous l'effet des interférons (Simmons et al., 2013; Stylianou et al., 2000) a été la plus étudiée. Les taux élevés d'IP10 en primo-infection sont associés à l'importance de la charge virale au set point ainsi qu'avec le risque de baisse des LT CD4 (Liovat et al., 2012). En phase chronique, il a été récemment montré qu'IP10 restait élevé chez les patients sous traitement antirétroviral efficace au long cours (Kamat et al., 2012; Ramirez et al., 2014) et était associé à la dysfonction lymphocytaire T (Ramirez et al., 2014).

Le poids des molécules d'adhésion cellulaire a également été évalué depuis de nombreuses années, comme reflet de l'altération cellulaire – en particulier des cellules endothéliales ou de la barrière hémato-encéphalique. Ainsi, les formes solubles d'ICAM (intercellular adhesion molecule) et de VCAM-1 (vascular adhesion molecule 1) ont depuis 20 ans été étudiées chez les patients virémiques et sous traitement, en lien avec les infections opportunistes (Nordøy et al., 1996), les altérations neurocognitives (Heidenreich et al., 1994) ou le risque de progression sous traitement (Mastroianni et al., 2000). L'analyse de ces biomarqueurs semble être importante pour la

compréhension des événements cardiovasculaires chez les patients infectés par le VIH (Baker et al., 2010), en lien avec des marqueurs d'activation de la coagulation distincts des D-Dimères, comme le PAI-1 (Knudsen et al., 2014; Lacerda et al., 2014). En particulier, les taux de sICAM et de sVCAM-1 sont associées à la charge virale élevée ainsi qu'au risque cardio-métabolique (Lacerda et al., 2014; Rönsholt et al., 2013).

Enfin, les formes solubles des marqueurs d'activation monocytaire, en particulier le CD14 soluble et le CD163 soluble, ont été beaucoup étudiées ces dernières années. Ainsi, le CD14, marqueur de la lignée monocytaire, est clivé en réponse à leur activation, notamment par les mécanismes endotoxiniques médiés par le LPS, et ses taux sont élevés dans de multiples pathologies inflammatoires (Scherberich and Nockher, 1999). Au cours du VIH, ses liens notamment avec le risque de désordres neurocognitifs précoces ont été établis (Lyons et al., 2011), ainsi qu'avec la mortalité toute cause (Sandler et al., 2011). Le CD163, appartenant à la superfamille des récepteurs scavenger riches en cystéine (SRCR-SF) de classe B est exprimé à la surface des macrophages (Akila et al., 2012). Il peut être clivé dans de multiples situations pro-inflammatoires, et ses taux solubles sont mesurables en ELISA. Au cours du VIH, l'équipe de T.Burdo a notamment montré que les taux de CD163 solubles étaient élevés chez les patients virémiques, et diminuaient sous traitement ARV sans revenir au niveau des personnes non infectées (Burdo et al., 2011a). Plus encore, il a été montré que la persistance de taux élevés de CD163 soluble était associée au risque cardiovasculaire (Burdo et al., 2011b; Pereyra et al., 2012) et neurocognitif précoce (Burdo et al., 2013b).

2.2. Marqueurs cellulaires

Outre les marqueurs solubles, l'étude du profil d'expression des marqueurs cellulaires a permis de mieux comprendre la pathologie du VIH.

Ainsi, il a été très tôt montré que les LT CD4 comme CD8 des patients infectés par le VIH exprimaient les marqueurs d'activation CD38 et HLA-DR, tant en fréquence de cellules HLA-DR+/CD38+ qu'en intensité, et que cette activation était liée à la baisse des CD4 circulants, au risque d'infections opportunistes et à la progression virologique (Cao et al., 2009; Deeks et al., 2004; Giorgi et al., 1999; Hunt et al., 2008, 2011a).

Cependant, outre les marqueurs HLA-DR et CD38 à la surface des cellules, d'autres marqueurs d'expression reflétant l'homéostasie lymphocytaire au cours du VIH sont utilisés dans les études. Ainsi, le profil de senescence CD28-/CD57+, ainsi que l'expression du marqueur d'épuisement PD-1, sont associés à une perte de fonction lymphocytaire T CD8 et CD4 mais également B, par une réduction des voies de costimulation lymphocytaire (Brenchley et al., 2003; Day et al., 2006; Petrovas et al., 2009; Porichis et al., 2014).

L'utilisation d'analyses combinées de ces biomarqueurs, qu'il s'agisse d'études multiplex combinant plusieurs cytokines/chimiokines quantifiées dans le même prélèvement, ou d'analyses statistiques multiples incluant les marqueurs cellulaires, offrent la possibilité de l'analyse en « signature » (Card et al., 2012; Cozzi-Lepri et al., 2011; Guzmán-Fulgencio et al., 2011; Kamat et al., 2012; Liovat et al., 2012; Redd et al., 2009). Notamment, le profil d'expression des marqueurs d'activation/inflammation peut orienter vers une voie physiopathologique activée de manière prépondérante pour expliquer un phénotype clinique donnée (ex : HIV controllers, patients virémiques progressifs...). Néanmoins, ces techniques nécessitent d'être utilisées et analysées avec précaution, du fait de la nécessité de prendre en compte les comparaisons multiples dans les résultats, de s'assurer de la validité technique de la méthode utilisée, et de la manière dont les prélèvements ont été manipulés – la plupart des cytokines ne

tolérant pas plusieurs cycles de congélation/décongélation (Lynch et al., 2014; Marquette et al., 2012).

Ainsi, de multiples biomarqueurs d'activation immunitaire et d'inflammation peuvent être utilisés. En particulier, des études visant à caractériser des « profils d'expression », utilisant de multiples biomarqueurs, ont permis de caractériser certains biomarqueurs comme étant associés à l'évolution de la pathologie. En outre, ces profils ont également permis de mieux comprendre les causes de cette activation immunitaire chronique au cours du VIH, afin de mieux la cibler au plan thérapeutique.

3. Génèse de l'inflammation au cours de l'infection par le VIH

Les causes de déclenchement et d'entretien de l'activation immunitaire et de l'inflammation au cours du VIH sont multiples et résumées dans la **Figure 13**.

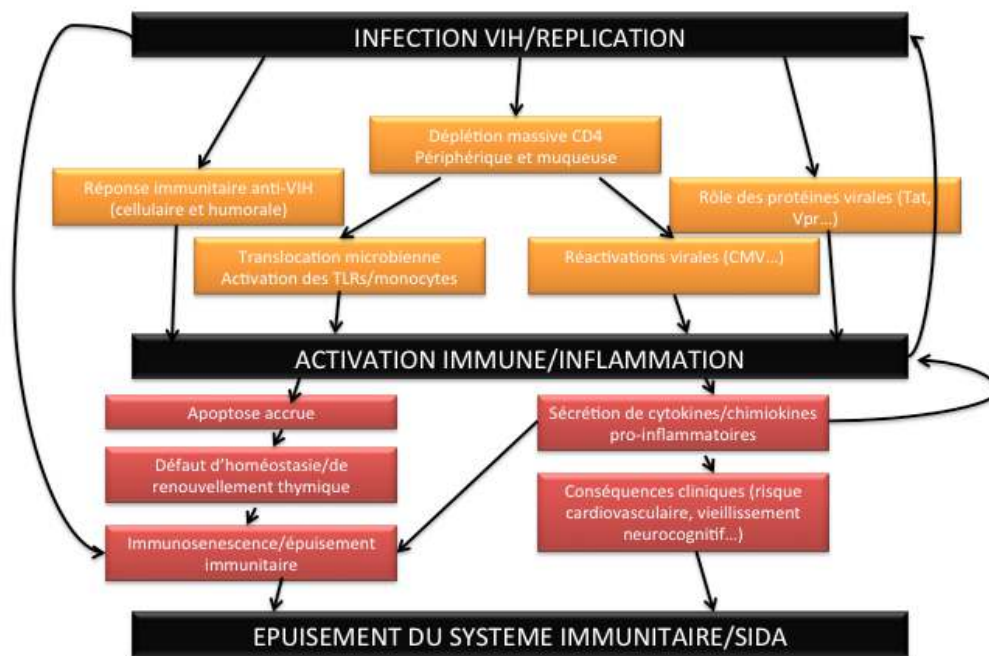


Figure 13. Représentation des causes d'activation immunitaire et d'inflammation au cours du VIH, ainsi que ses conséquences immuno-cliniques. Adapté d'après (Appay and Sauce, 2008)

Comme nous l'avons décrit, un rôle important est à attribuer à la translocation de produits microbiens favorisée par l'altération des barrières de la muqueuse digestive. Différents marqueurs de cette translocation et de l'activation immunitaire en résultant ont été étudiés. Parmi ces marqueurs, I-FABP (intestinal fatty acid binding protein), un marqueur d'apoptose entérocytaire, est élevé et est lié à la magnitude de la réplication virale (Chevalier et al., 2013; Escoté et al., 2011; Hunt et al., 2014). Cependant, le meilleur reflet de cette altération muqueuse, est probablement la mesure du passage trans-muqueux de produits microbiens, comme en atteste l'élévation des taux de lipopolysaccharide bactérien (LPS). Brenchley *et al*, en 2006, ont ainsi montré que cette

élévation du LPS était corrélée aux stades de la pathologie liée au VIH et dépendait au moins en partie de la réplication virale (Brenchley et al., 2006). En effet, le LPS était plus élevé chez les patients infectés chroniquement et non traités, que les patients contrôlant le virus sous traitement, voire spontanément (patients HIV controllers).

Plus encore, ces taux de LPS sont responsables d'une activation monocytaire importante, eux-mêmes jouant un rôle central dans la genèse de l'inflammation chronique. En effet, le LPS est reconnu à la surface des monocytes par le TLR4 associé au récepteur CD14/MD2, déclenchant par son internalisation l'activation des monocytes.

Depuis ces travaux, d'autres marqueurs dits de « translocation microbienne » (LBP, EndoCAb, ADN 16S bactérien), ont été analysés et leur apport est variable selon les études. En effet, il semble selon certains auteurs que le LPS et le LBP soient les meilleurs reflets de l'altération muqueuse, en lien avec l'activation monocytaire et le CD14 soluble (Abad-Fernández et al., 2013). Néanmoins, la quantification de la charge bactérienne par PCR en temps réel de l'ADN 16S ribosomal est selon d'autres études, bien corrélée au LPS (Kramski et al., 2011).

D'une manière générale, le modèle proposé par Brenchley *et al* reste le plus adapté aux connaissances actuelles, et confère aux altérations précoces de la barrière muqueuse un rôle important dans la genèse de l'activation immune et de la pathogénie du VIH.

Au-delà du rôle de la translocation bactérienne, un rôle direct du virus peut être évoqué. En effet, la captation des particules virales – infectieuses ou non -, notamment au niveau tissulaire, par les cellules du système immunitaire favorise la cascade de production des IFN type I et des cytokines pro-inflammatoires (Levy et al., 2011; Stacey et al., 2009). Dans ce contexte, la présentation des peptides viraux par les pDCs, l'infection des macrophages ou encore le fait que les FDCs soient capables de conserver à leur surface

des particules virales de manière prolongée, jouent des rôles importants dans le maintien de l'inflammation. Une faible charge virale résiduelle sous traitement est encore associée à la persistance d'une activation immune à bas bruit (Hatano et al., 2013a; Zheng et al., 2014). Certaines protéines du VIH, par elles-mêmes sont capables d'activer différents types cellulaires. Cela a été bien montré avec les protéines Tat et Vpr (Hoshino et al., 2010; Nicoli et al., 2013). Enfin, l'activation immune et l'inflammation sont entretenues avec les infections associées, telles que le CMV, la tuberculose, les virus des hépatites B et C, l'exposition au tabac ou à l'alcool, etc... (Lee et al., 2014)

Enfin, il est à noter que la baisse des LT CD4 elle-même peut être responsable de l'entretien de l'activation immunitaire. En effet, les mécanismes d'homéostasie se mettent en place en réponse à cette diminution des lymphocytes circulants, entraînant la production de cytokines visant à régénérer les cellules et les activer pour permettre leur renouvellement (IL2, IL7).

De proche en proche, cette activation dérégulée conduit à l'épuisement lymphocytaire et à un cercle vicieux d'activation immune.

III. Modèles de contrôle de l'infection par le VIH

Si au cours de l'infection par le VIH, les mécanismes précis permettant l'éradication du virus ne sont pas connus, plusieurs modèles animaux existent et offrent depuis leur découverte, des perspectives d'études des mécanismes de contrôle du VIH. Ainsi, les modèles simiens et humains de contrôle de l'infection par le VIH sont de mieux en mieux caractérisés et permettent d'élucider certaines voies physiopathologiques cruciales dans la pathogénie du virus.

1. Modèles simiens

Dès le début de l'épidémie, le modèle macaque de l'infection par le virus de l'immunodéficience simienne (SIVmac) a été le modèle de choix pour les études physiopathologiques en parallèles à l'étude du VIH. En effet, les SIV sont des lentivirus caractérisés depuis la fin des années 80s (Hirsch et al., 1989).

En milieu naturel, certains primates non-humains (PNH) sont chroniquement infectés par le SIV et ne développent pas de déficit immunitaire CD4 ni d'évolution vers un SIDA caractérisé. Les PNH africains de type *Sooty mangabey (Sm)*, *African green monkeys (agm)*, ainsi que les mandrills peuvent vivre avec de fortes charges virales SIV circulantes, et constituent des modèles d'infection non pathogène (Bosinger et al., 2012; Liovat et al., 2009). A l'inverse, les PNH d'Asie, tels les macaques Rhésus (*Rm*), ne sont pas infectés par SIV dans leur milieu naturel. Une infection exogène par des souches de laboratoire SIVmac, dérivées du virus infectant le singe *Sm* induit chez cette espèce une infection proche de celle observée par le VIH chez l'homme (Bosinger et al., 2012).

En particulier, une différence importante opposant ces deux types d'infection est l'absence d'activation immunitaire chronique observée chez les modèles d'hôtes non pathogènes (Bosinger et al., 2011; Rotger et al., 2011). Diverses hypothèses ont été soulevées pour expliquer les différences entre ces modèles :

-existe-t'il des différences sur les interactions entre le système immunitaire et les souches virales infectant ces espèces ?

-la réponse immune précoce, lors des premières étapes de l'infection, est elle mise en jeu de manière distincte ?

Plusieurs éléments sont maintenant connus, différenciant les modèles de primates non humains pathogènes et non pathogènes, et sont résumés dans le **Tableau 2**.

| Tableau 2. Présentation comparative des infections pathogènes et non pathogènes par le SIV. | | | | |
|--|----------------------------|----------------------------|--------------------------------|----------------------------|
| | Infection pathogène | | Infection non pathogène | |
| | Primo-infection | Infection chronique | Primo-infection | Infection chronique |
| Charge virale | | | | |
| <i>ARN plasmatique</i> | Elevée | Elevée | Elevée | Elevée |
| Déplétion lymphocytaire T CD4 | | | | |
| <i>Périphérique</i> | Oui | Oui | Oui | Non/faible |
| <i>Muqueuse</i> | Oui | Oui | Oui | Faible |
| Activation lymphocytaire T | | | | |
| <i>Périphérique</i> | Forte | Forte | Forte | Faible |
| <i>Ganglionnaire</i> | Forte | Forte | Faible | Faible |
| <i>Muqueuse</i> | Forte | Forte | Forte | Faible |

Parmi les facteurs viraux potentiellement impliqués dans ces différences, il semble que l'activité de *nef* soit distincte entre les souches SIVsm et SIVmac. Ainsi, alors que *nef*^{SIVsmm} induit une « protection » des hôtes non pathogènes par la régulation négative de l'expression du CD3 et la réduction de l'activation immune *via* le TcR, ceci est impossible pour *nef*^{SIVmac} (Kirchhoff and Silvestri, 2008; Schindler et al., 2008).

Par ailleurs, le niveau de réplication virale est important dans les cellules CD4 de courte durée de vie chez les hôtes non-pathogènes. Néanmoins ces espèces ont établi des moyens de réduction de la pénétration intracellulaire du virus. Notamment, l'expression du CD4 et du co-récepteur d'entrée CCR5 est diminué sur les cellules cibles (Beaumier et al., 2009; Paiardini et al., 2011; Pandrea et al., 2007).

Enfin, les modalités de présentation antigénique aux LT CD8 sont importantes, notamment chez les macaques porteurs de l'allèle Mamu-B*08. Cet allèle permet de restreindre les épitopes présentés de manière similaire à la restriction par l'allèle HLA-B27 chez l'Homme. Le fait d'être Mamu-B*08+ est associé à un phénotype de contrôle de l'infection par le SIV, suggérant un rôle important des LT CD8 dans le contrôle antiviral (Loffredo et al., 2009).

Néanmoins, la compréhension des mécanismes de pathogénicité du SIV chez les primates renvoie à la mise en jeu des mécanismes précoces de défense immunitaire.

Lors de l'infection par le SIV, plusieurs équipes ont décrit les modalités de mise en jeu du système immunitaire inné, en utilisant des méthodes d'analyses d'expression génique par microarrays. En 2009, 4 articles provenant de 3 équipes distinctes (Bosinger et al., 2009; Favre et al., 2009; Jacquelin et al., 2009; Lederer et al., 2009) ont été publiés, révélant les résultats d'études d'hôtes non pathogènes SM (Bosinger et al., 2009) ou AGM (Favre et al., 2009; Jacquelin et al., 2009; Lederer et al., 2009) comparés à des singes infectés par le SIV et malades.

Les principaux résultats ont montré que :

- l'infection par les souches SIV induisait une forte réponse anti-virale précoce, jusqu'au 60^{ème} jour post-infection

- en particulier, des gènes induisant l'expression de facteurs de restriction, des chimiokines/cytokines, ou des gènes induits par l'interféron étaient surexprimés
- une des différences essentielles entre les réponses des hôtes pathogènes et non pathogènes était la durée de cette expression de gènes impliqués dans les réponses antivirales ou l'activation immunitaire, grandement raccourcie chez les hôtes non pathogènes, tant au sein des cellules mononuclées sanguines (Lederer et al., 2009) qu'au sein des cellules CD4 du sang comme des tissus lymphatiques (Jacquelin et al., 2009) (**Figure 14**).

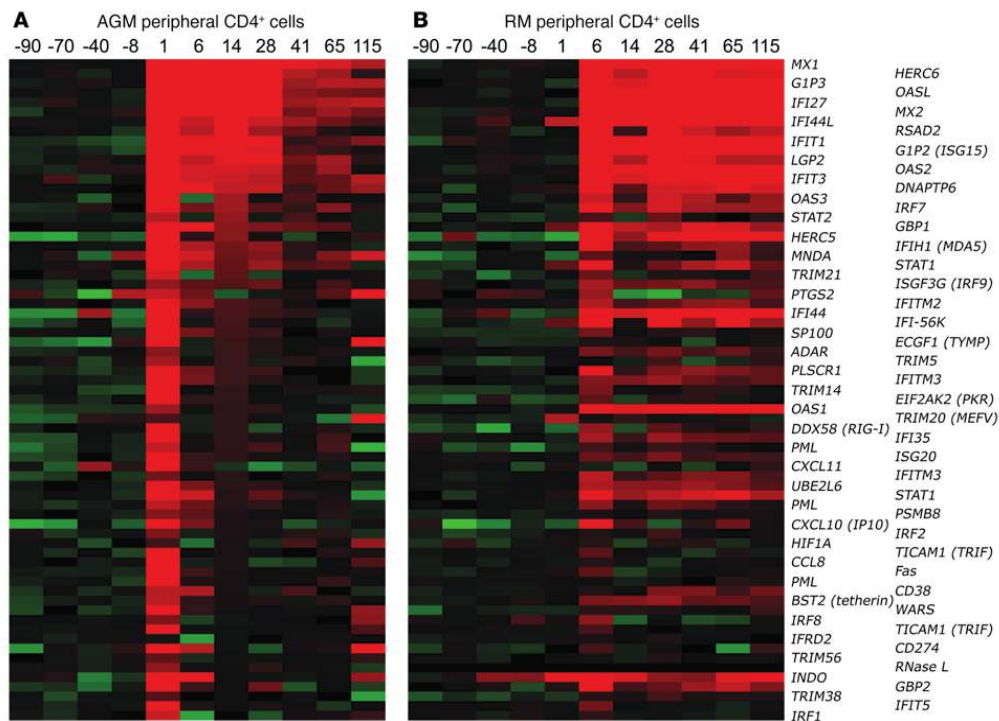


Figure 14. Présentation des analyses de transcriptome effectuées sur les LT CD4 périphériques des singes AGM (panel de gauche) comparativement aux singes RM (panel de droite). Chez les AGM (non pathogènes), l'activation des voies associées à la production d'ISGs est rapidement circonscrite, comparativement aux hôtes pathogènes chez lesquelles cette activation persiste dans le temps. D'après (Jacquelin et al., 2009).

En particulier, un rôle de la voie des interférons et de la production d'ISGs lors de la réponse précoce a été soulevé. Les SM et AGM ont une réponse ISG aussi forte en intensité que les RM, mais celle-ci s'arrête plus précocement. Cela permet d'émettre l'hypothèse d'un lien entre ce constat et le profil d'activation distinct en phase chronique.

Un rôle de la réponse IFN est possible dans l'établissement initial de l'activation immune (expliquant le maintien de l'expression du marqueur d'activation HLA-DR à la surface des LT CD4 et CD8, de même que le recrutement de lymphocytes PD1+, chez les hôtes non pathogènes, entre J3-30 p.i.). Cependant, l'arrêt contrôlé de cette activation interféron est probablement en cause dans la diminution en phase chronique des paramètres d'activation et d'inflammation des hôtes non pathogènes.

Parmi les mécanismes plus récemment étudiés, le rôle de facteurs de restriction semble également important. En effet, outre le blocage de l'entrée du virus (diminution des cor-récepteurs CD4 et CCR5), les hôtes non-pathogènes ont établi des mécanismes intracellulaires permettant de réduire la réplication virale (Bosinger et al., 2009; Jacquelin et al., 2009).

En résumé, l'étude des modèles primates non-humains d'infection par le SIV a permis, par la caractérisation des réponses immunes des hôtes pathogènes et non-pathogènes, d'établir un rôle potentiel de la voie de l'interféron et de l'impact de sa régulation dans le contrôle de l'activation immune chez les sujets infectés chroniquement.

2. Modèles humains

Rapidement après le début de la pandémie VIH, certains patients pour lesquels le profil de progression était moindre ont été caractérisés. Ces patients, définis essentiellement sur une base immunologique (maintien d'un taux élevé de LT CD4 dans le temps, sans traitement, indépendamment de leur charge virale), ont été colligés dans différentes cohortes sous des noms variables (long term non progressors (LTNPs), asymptomatiques à long terme (ALT), etc...) (Cao et al., 1995; Grabar et al., 2009; Strathdee et al., 1996). Plusieurs caractéristiques de ces groupes de patients ont été identifiées afin d'expliquer ce profil de moindre progression. Ainsi, il est apparu qu'une partie de ces patients étaient infectés par un virus muté pour *nef*. Pour d'autres patients, une combinaison de polymorphismes de résistance (notamment $\Delta 32$ pour CCR5) ou une génétique favorable (surreprésentation des allèles HLA B57/B27 dans cette population) a été mise en évidence (Grabar et al., 2009; Learmont et al., 1999; Magierowska et al., 1999; Navis et al., 2007, 2008). Un rôle de la réponse immunitaire est également considéré, comme en atteste les taux élevés d'anticorps neutralisants (Braibant et al., 2006; Carotenuto et al., 1998; Zhang et al., 1997) ou la polyfonctionnalité des réponses T CD4 et CD8 (Alatrakchi et al., 2002; Boaz et al., 2002; Van Braeckel et al., 2013; Buckheit et al., 2013; Dyer et al., 2008; Jansen et al., 2006; Jiao et al., 2006; Propato et al., 2001). Néanmoins, si le groupe des patients asymptomatiques à long terme représente un grand intérêt dans la compréhension des mécanismes immunologiques ce groupe est hétérogène et chez la majorité d'entre eux, la charge virale augmente et le taux de T CD4 diminue, une évolution vers le stade SIDA pouvant être observée (Grabar et al., 2009; Lefrère et al., 1997; Okulicz et al., 2009).

Dans ce contexte, la description depuis 10 ans d'un autre groupe de patients définis sur une base virologique (charge virale contrôlée sans traitement, indépendamment du taux de LT CD4) a permis de multiples avancées. Ces patients rares sont décrits simultanément aux USA et en France, sous le nom de « elite controllers », « elite suppressors », « elite non progressors » ou « HIV controllers », et représentent 0.5 à 1% des patients infectés (Deeks and Walker, 2007; Lambotte et al., 2005). De multiples définitions existent dans la littérature, rendant parfois difficile l'analyse des études au vu de l'hétérogénéité des groupes décrits (Gurdasani et al., 2014; Olson et al., 2014)(Figure 15).

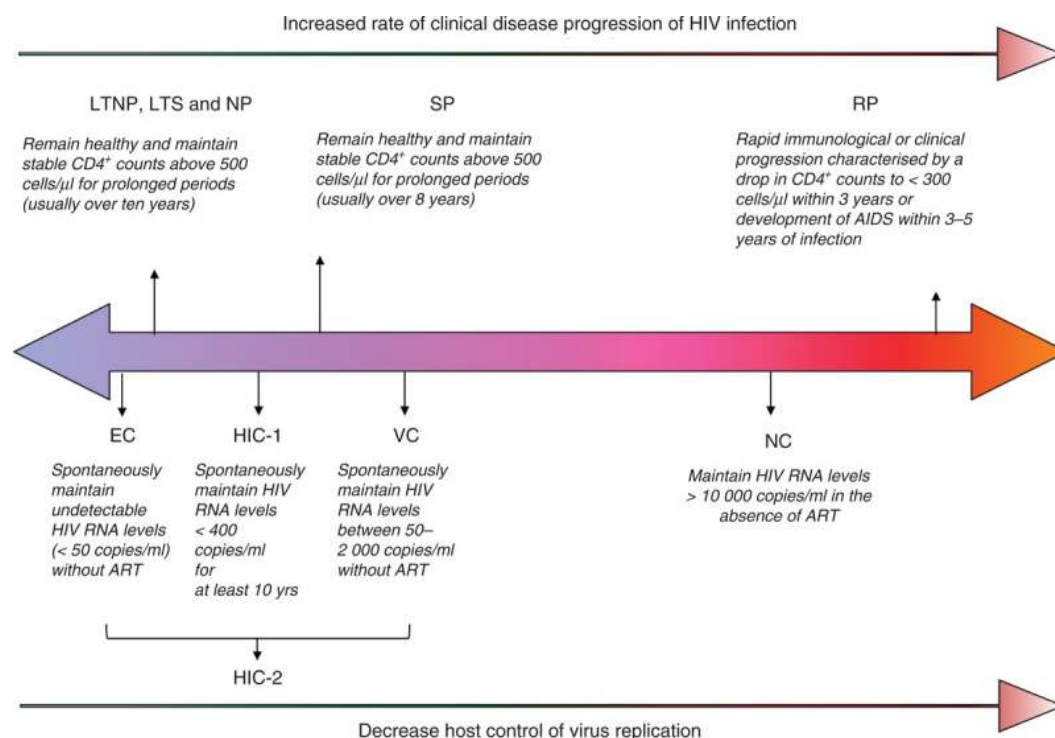


Figure 15. Multiplicité des définitions utilisées pour caractériser les phénotypes extrêmes de patients infectés par le VIH. D'après (Gurdasani et al., 2014).

La définition actuelle utilisée dans la cohorte française ANRS CO21 CODEX (COhorte Des EXtrêmes) est basée sur 5 charges virales consécutives < 400 copies/mL chez des patients suivis depuis au moins 5 ans sans traitement. Le seuil de 400 copies a été choisi car il correspond aux seuils de détection des premières techniques de quantification de charge virale utilisées dans les années 1995.

Trois hypothèses complémentaires peuvent expliquer ce contrôle spontané du VIH : le rôle du virus lui-même (virus atténué ?), le rôle du terrain génétique du patient et enfin la nature de la réponse immunitaire anti-virale. En outre, l'importance de l'inoculum viral initial peut être évoquée, mais cette hypothèse n'est pas testable chez l'homme.

L'étude des caractéristiques virologiques, génétiques et immunologiques de ces patients est donc fondamentale afin d'améliorer la compréhension du contrôle spontané de la réplication du VIH.

2.1. Pathogénicité du virus

L'indéfectibilité de la charge virale par les techniques commerciales, ainsi que les faibles quantités d'ADN viral détectées (Hatano et al., 2009; Lambotte et al., 2005) ont fait évoquer la possibilité de souches virales atténuées chez les patients HIV controllers, à l'instar de certains patients LTNPs. Cependant, plusieurs équipes ont montré que les patients HIV controllers (HICs) sont globalement infectés par des souches virales normalement répliquatives (Blankson et al., 2007; Lamine et al., 2007; Miura et al., 2008). En effet, les souches virales isolées des cultures de LT CD4 activés sont compétentes pour la réplication *in vitro*, sont capables d'infecter des LT CD4 hétérologues et l'analyse génétique des souches de VIH isolées ne montre que de rares mutations dans les régions

nef, *LTR* et *vif*, sans retentissement sur les fonctions virales (Lamine et al., 2007; Miura et al., 2008). En outre, l'absence d'anomalie répliquative est confirmée par l'existence d'une répllication virale détectable selon des méthodes de quantification ultra-sensible (Hatano et al., 2009) et par la répllication des virus dans un modèle de souris humanisée (Salgado et al., 2014). Certains auteurs ont également mis en évidence une capacité d'évolution du génome viral, allant dans le sens d'une répllication résiduelle subissant la pression des réponses immunitaires T CD8 (Bailey et al., 2007; O'Connell et al., 2010). Les réponses immunitaires spécifiques anti-VIH, ainsi que les facteurs de restriction, limitent donc la répllication virale et contribuent à une taille de réservoirs plus basse. En effet, la quantification de l'ADN viral cellulaire est la plus faible chez les patients HIV controllers, comparativement à d'autres groupes de patients infectés (Lewin and Rouzioux, 2011).

Il ne semble pas exister d'argument pour des souches virales défectives qui expliqueraient le contrôle spontané de l'infection chez les patients HIV controllers.

2.2. Susceptibilité de l'hôte et immunité naturelle antivirale

La présence des allèles HLA B57 et B27, portant le motif Bw14, ainsi que l'absence de B35, est associée au phénotype HIV controller (Emu et al., 2005; Migueles et al., 2000; Navis et al., 2008), avec une surreprésentation de ces allèles (retrouvés chez 45 à 86% selon les cohortes considérées (Boufassa et al., 2011; Madec et al., 2013; Olson et al., 2014). Cette association a été retrouvée par des études génomiques visant à étudier les polymorphismes nucléotidiques associés à un meilleur contrôle de la charge virale (Dalmaso et al., 2008; Fellay et al., 2007). Deux régions d'intérêt ont été mises en évidence : l'une proche de HLA B57*01, l'autre à proximité de HLA-C.

Cette association entre le CMH de classe I et le contrôle antiviral suggère un fort rôle de l'immunité antivirale CD8. Par ailleurs, le rôle de ces molécules pourrait être en lien avec l'activation de cellules de l'immunité innée, telles les cellules NK, conduisant à la destruction de la cellule infectée. En effet, une association protectrice a pu être montrée entre certains allèles du gène KIR3DL1 et certaines molécules du groupe HLA-Bw4 contenant une Isoleucine en position 80 – dont HLA-B57 et B27. L'engagement d'autres récepteurs activateurs, tels KIR3DS1, ou la perte du signal inhibiteur médiée par KIR3DL1 pourrait entraîner dans ces conditions une activation efficace des cellules NK (Martin et al., 2007).

Par ailleurs, il a été montré que certains HICs contrôlaient la réplication virale *in vitro* en l'absence d'une activation immunitaire (notamment CD8) importante (Sáez-Cirión et al., 2009). Chez ces patients, l'implication de mécanismes de l'immunité naturelle antivirale, comme les facteurs de restriction des infections rétrovirales peut être évoqué. Dans ce contexte, plusieurs équipes ont analysé le rôle de la protéine p21 dans le blocage de la réplication virale des HICs. Ainsi, l'équipe de M. Lichterfeld a montré que les LT CD4 des HICs pouvait être moins susceptibles à l'infection par le VIH par un mécanisme impliquant une uprégulation de p21, *via* une inhibition de CDK9, un coactivateur de la transcription des gènes viraux (Chen et al., 2011). De même, nos collaborateurs dans l'équipe d'Asier Sáez-Cirión ont montré le rôle de p21 dans les mécanismes de restriction du virus des macrophages et des LT CD4 des HICs. Ce blocage implique un mécanisme de saturation, puisqu'un plus grand inoculum viral *in vitro* est capable de rétablir l'infection des cellules (Sáez-Cirión et al., 2011). En outre, le rôle d'autres molécules, dont une partie est sous la dépendance de la production d'IFN de type I, comme TRIM5 α , SAMHD1 ou SCHLAFEN11, doit être précisé chez les HICs (Abdel-

Mohsen et al., 2013; Granier et al., 2013; Riveira-Muñoz et al., 2014; Sáez-Cirión et al., 2011).

Néanmoins, ces associations avec la génétique ou l'immunité naturelle n'expliquent pas le contrôle anti-viral chez tous les patients, confirmant que d'autres facteurs sont intriqués pour expliquer ce phénotype.

2.3. Rôle de l'immunité cellulaire T CD8.

La surreprésentation des haplotypes HLA de classe I est un argument en faveur d'une réponse T CD8 optimisée par une meilleure présentation épitopique et une meilleure interaction CMH-peptide avec le TCR des lymphocytes T CD8 spécifiques du VIH (Buckheit et al., 2013; Hua et al., 2014; Lécuroux et al., 2014; Migueles et al., 2003; Sáez-Cirión et al., 2007). Les LT CD8 des patients controllers jouent un rôle essentiel dans le blocage de la réplication virale, puisque cette réplication redevient détectable dans des fractions de PBMCs déplétées en lymphocytes T CD8. Il a également été montré que les lymphocytes T CD8 éliminent les LT CD4 infectés par une cytotoxicité nécessitant un contact cellulaire (Sáez-Cirión et al., 2007, 2009). Cette capacité de blocage de la réplication virale est corrélée au nombre de lymphocytes T CD8 spécifiques du VIH quantifiés en ELISPOT IFN γ (Sáez-Cirión et al., 2009). Notamment, les réponses lymphocytaires T CD8 spécifiques anti-*gag* semblent les plus importantes chez les patients controllers car ce sont celles qui sont corrélées au contrôle de la réplication virale (Sáez-Cirión et al., 2009).

Cette réponse spécifique anti-VIH forte et ce contrôle antiviral propre aux HICs contraste avec la réponse faible observée chez les patients sous traitement ARV efficace (Lécuroux et al., 2013). Cette capacité suppressive conservée pourrait être en lien avec

la persistance d'une répllication virale résiduelle très faible (Hatano et al., 2009, 2013a; Hua et al., 2014).

Au plan qualitatif, les lymphocytes T CD8 spécifiques du VIH sont polyfonctionnels, conservant leurs capacités de production de cytokines (IFN γ , IL2), de prolifération, de dégranulation et de cytotoxicité (Betts et al., 2006; Migueles et al., 2008; Sáez-Cirión et al., 2007). Ainsi, il existe une corrélation entre la réponse spécifique anti-*gag* et la capacité à bloquer la répllication virale. Cette capacité d'élimination rapide des cellules infectées est associée au maintien d'un phénotype effecteur chez les patients controllers. En outre, cette réponse T CD8 spécifique anti-*gag* est prépondérante chez les HICs, et est présente tant en périphérie qu'au niveau tissulaire (Shacklett and Ferre, 2011). Chez un certain nombre de patients - controllers comme progressseurs - la réponse CTL peut être détectée dans les tissus, de manière au moins comparable voire supérieure à celle détectée dans le sang. La qualité de cette réponse CTL est meilleure chez les HICs que les patients progressseurs.

L'état d'activation des lymphocytes T CD8 est particulier par une expression différentielle des molécules DR et CD38 conduisant au phénotype HLA-DR^{high}/CD38^{low}. L'expression faible de CD38 peut traduire une plus faible activation que chez les patients virémiques, explicable par une moindre exposition antigénique liée à la faible charge virale chez les controllers. La discordance avec l'expression forte de HLA-DR témoignerait des fortes capacités de prolifération de ces lymphocytes (Hua et al., 2014; Sáez-Cirión et al., 2007).

Enfin, d'autres analyses phénotypiques ont montré que les lymphocytes T CD8 spécifiques des patients controllers n'exprimaient pas CD57 (Lécuroux et al., 2009a), et

que l'expression de PD-1 était réduite (Zhang et al., 2007) chez ces patients, expliquant en partie les capacités accrues de survie de ces cellules spécifiques.

Les lymphocytes T CD8 des patients HIV controllers sont polyfonctionnels et activés, en particulier concernant la réponse T CD8 spécifique anti-gag.

2.4. Rôle de l'immunité cellulaire T CD4.

Au sein des patients HIV controllers, le nombre de LT CD4 mémoires centraux persiste, et leur fonctionnalité évaluée par leurs capacités de production d'IL2 et de prolifération à la stimulation antigénique est préservée (Harari et al., 2005; Potter et al., 2007). S Potter et al. montrent par ailleurs le maintien d'un pool de LT CD4 mémoires effecteurs polyfonctionnels et le maintien d'une réponse T CD4 spécifique anti-HIV chez les controllers (Potter et al., 2007). L'importance de cette réponse spécifique anti-VIH polyfonctionnelle est soulignée par le groupe de S Deeks (Emu et al., 2008), pour lequel le nombre de LT CD4 spécifiques de la protéine *gag* polyfonctionnels IL-2+ IFN γ + serait l'un des meilleurs marqueurs associé au contrôle de la charge virale. La production par les LT CD4 spécifiques anti-gag de IL2, TNF α et IFN γ est préservée chez les controllers et ce pourcentage de cellules « triples productrices » semble inversement corrélé au taux de charge virale (Kannanganat et al., 2007). Par ailleurs, on retrouve chez les HICs la présence de clones T CD4 spécifiques de certains épitopes de gag dotés d'une grande avidité (Vingert et al., 2010, 2012).

La régulation des phénotypes de différenciation Treg/Th17 dans l'homéostasie immunitaire semble également importante. En effet, il a été montré que les controllers avaient des ratio Th17/T régulateurs maintenus, par opposition aux patients progressseurs chez lesquels les lymphocytes Th17 sont diminués (Favre et al., 2009;

Hunt et al., 2011b). Cette constatation a été faite tant au niveau périphérique qu'au niveau de la muqueuse digestive, confortant le rôle de cette muqueuse dans la pathogénie du VIH, puisqu'une balance Th17/Treg diminuée est associée au passage transmuqueux de produits microbiens et à l'inflammation systémique. Egalement, les marqueurs d'épuisement lymphocytaire comme PD-1 sont moins exprimés à la surface des LT CD4 des elite controllers comparativement aux patients sous ARV (Whittall et al., 2011). Il a pu être montré que la sensibilité de ces cellules à l'apoptose médiée par TRAIL/DR5 était réduite chez les patients controllers (Barblu et al., 2014). Enfin, le renouvellement thymique des patients HIV controllers est préservé. En effet, les taux de sjTRECs, reflétant la prolifération intrathymique, sont plus élevés que chez les patients virémiques (Sauce et al., 2011; Westrop et al., 2009). Cet ensemble de constatation explique le maintien d'une réponse polyfonctionnelle T CD4.

Les LT CD4 mémoires centraux sont préservés et polyfonctionnels chez les HIV controllers. Leurs capacités de production de cytokines (IL2, IFN γ) et de lymphoprolifération sont conservées.

2.5. Rôle de l'immunité humorale

Le rôle des anticorps neutralisants (AcN) a été suggéré dans le contrôle antiviral des patients HIV controllers. Mahalanabis et al suggèrent, en étudiant des sujets « viremic controllers» (50-2000 copies/mL) et « elite controllers» (< 50 copies/mL), que l'existence d'anticorps neutralisants, spécifiques d'épitopes de *env*, conduit à une pression de sélection sur les souches virales (Mahalanabis et al., 2009).

Cette réponse humorale est cependant hétérogène. Plusieurs groupes (Bailey et al., 2006; Doria-Rose et al., 2010) ont montré que les taux d'anticorps neutralisants, qu'ils

soient dirigés contre le virus autologue comme contre des souches hétérologues, étaient plus faibles chez les contrôleurs que chez des patients virémiques, suggérant que l'absence d'exposition antigénique chez les contrôleurs diminuait la synthèse d'anticorps. Ainsi, il existe une hétérogénéité importante dans les titres d'AcN selon les patients (Lambotte et al., 2009; Pereyra et al., 2008) que l'on regarde les AcN « classiques » qui inhibent la réplication virale par le fragment Fab ou ceux qui inhibent le virus par le biais du fragment Fc. En outre, la spécificité et le taux des AcN ne sont pas corrélés à l'intensité de la réponse T CD8 spécifique (Lambotte et al., 2009). Néanmoins, la réponse cellulaire cytotoxique médiée par les anticorps (ADCC) et l'inhibition virale dépendante des anticorps semble importante chez les patients HIV contrôleurs (Ackerman et al., 2013; Lambotte et al., 2013).

La réponse humorale chez les patients contrôleurs semble importante en terme d'ADCC. Néanmoins, le rôle précis des anticorps neutralisants reste à caractériser.

2.6. Devenir des patients HIV contrôleurs et risque de progression

Comme nous l'avons décrit, les patients HIV contrôleurs sont hétérogènes dans les caractéristiques de leur système immunitaire et les mécanismes de leur contrôle antiviral. De même, l'évolution à long terme de ces patients est une question importante, dépendant entre autres de la définition utilisée à la base (Gurdasani et al., 2014; Olson et al., 2014). Dans l'étude américaine d'Okulicz (Okulicz et al., 2009), il semble ainsi que les patients « elite contrôleurs » conservent en effet des taux de LT CD4 élevés et ne progressent pas vers le SIDA à la différence des « viremic contrôleurs » chez qui 23% finissent par être traités par anti-rétroviraux avec une baisse des taux de LT CD4. Les patients HIV contrôleurs inclus dans la cohorte Française présentent ainsi pour la

plupart une baisse lente et progressive des LT CD4 (Boufassa et al., 2011). De même, dans l'étude de P.Hunt *et al*, 10% (3/30) des patients HIV controllers sont à risque de progression vers un stade SIDA et de traitement. Ces données ont été confortées récemment par celles de la cohorte Internationale CASCADE (Madec et al., 2013), retrouvant un taux de maintien de 75% à 20 ans post-séroconversion chez 140 controllers.

Les causes de ce risque de progression sont pour le moment peu décrites. Dans la cohorte Française comme dans CASCADE, la survenue de blips de réplication virale était associée d'une part, au risque de baisse des LT CD4, d'autre part, au risque de perte de contrôle virologique. La persistance du virus, même à de très faibles taux, induit probablement une stimulation antigénique suffisante pour le maintien d'une activation immunitaire dont les conséquences à long terme chez les controllers sont peu connues.

3. Données d'activation immune et d'inflammation dans les modèles de contrôle du VIH

Dans toutes les données concernant l'activation immunitaire et les biomarqueurs d'inflammation chez les patients virémiques et sous traitement, il apparaît que la réplication virale, y compris à bas bruit (Eastburn et al., 2011; Hatano et al., 2013a), est responsable en partie de l'activation immunitaire au cours de l'infection à VIH.

Dès lors, l'intérêt a émergé d'inclure comme groupe « contrôle » des patients chez lesquels la charge virale était spontanément basse voire indétectable sans traitement. En effet, l'étude des patients HIV controllers permet de s'affranchir de l'effet des traitement comme facteur confondant potentiel sur les variations de biomarqueurs, ainsi que des infections opportunistes, puisque les CD4 restent en général plus élevés (Boufassa et al., 2011).

Concernant l'activation cellulaire, il a été rapidement montré que les HICs présentaient une activation immunitaire réduite comparativement aux patients virémiques, mais plus élevée que les personnes non infectées (Emu et al., 2005; Hunt et al., 2008; Sáez-Cirión et al., 2007), attestée par le pourcentage plus élevé de LT CD4 et CD8 HLA-DR+/CD38+. Cependant, nous avons pu montrer au sein de la cohorte ANRS HIV controllers que cette activation, notamment des LT CD8, était supérieure à celle des patients sous traitement ARV efficace (Hua et al., 2014; Sáez-Cirión et al., 2007), soulignant les possibilités qu'une lutte active anti-virale pouvait conduire à un état d'activation immune minimal mais anormalement persistant, avec également un impact de la réplication virale quantifiable à bas bruit chez une partie des patients controllers, à l'instar des patients traités (Hatano et al., 2009, 2010).

Par ailleurs, des études plus récentes ont analysé le profil d'expression cytokiniques des patients HIV controllers, comparativement aux patients virémiques ou traités. Hsue *et al* ont ainsi montré en 2009 que ces patients (n=33 dans cette étude) avaient des taux de CRP ultra-sensible anormalement élevés (Hsue et al., 2009), en lien avec les marqueurs morphologiques d'athérosclérose infraclinique (épaisseur intima-média artérielle), témoin d'un risque possible cardiovasculaire accru.

La même équipe a montré, sur un nombre plus restreint de controllers répondant à la définition américaine (n=10, CV < 50 copies/mL sur 3 mesures successives et un an de recul), que les taux de CD163 soluble, CD14 soluble et IP10 étaient plus élevés que les personnes non infectées. Par ailleurs, les taux de CD163 soluble étaient également supérieurs à ceux du groupe de patients sous ARV (n=103 patients traités et contrôlés en phase chronique), en lien avec la fréquence de plaques calciques coronariennes, témoin d'un remaniement vasculaire pro-athérogène (Pereyra et al., 2012). Dans cette

étude cependant, les taux de CRP ultra-sensible et d'IL6 ne différaient pas entre les HICs et les patients sous ARV. La cohorte canadienne a évalué le profil de production cyto/chimiokinique des patients HIV controllers, retrouvant des taux plus bas de MCP1, IP10 ou TGF β que les patients virémiques. Par ailleurs, ces patients présentaient des niveaux réduits d'activation lymphocytaires T CD8, en lien avec un nombre préservé de LT régulateurs (Card et al., 2012). Dans ces études néanmoins, les auteurs n'analysaient pas le lien avec la charge virale ARN ni le taux d'ADN viral cellulaire.

Plus récemment enfin, l'équipe d'I. Sereti a évalué, sur un nombre conséquent (n=68) de patients elite controllers, les paramètres d'inflammation, d'activation de la voie des Interférons de type I et du compartiment monocyttaire (Krishnan et al., 2014). Cette étude, menée en même temps que nos travaux, a permis de montrer qu'en dépit de leur charge virale indétectable, les patients elite controllers présentaient une activation monocyttaire anormale, attestée par l'expression du marqueur de surface CD16 et leur capacité accrue de réponse à la stimulation par le LPS et à produire des cytokines pro-inflammatoires.

Ainsi, plusieurs éléments convergent en montrant que les patients HIV controllers, en dépit du contrôle antiviral médié en partie par une réponse immunitaire forte, présentent des niveaux anormaux d'activation immune et d'inflammation.

OBJECTIFS DES TRAVAUX

Les patients HIV controllers ont ainsi une charge virale spontanément contrôlée en l'absence de traitement anti-rétroviral. Ces patients ont cependant un phénotype hétérogène, certains d'entre eux ayant une charge virale toujours en dessous du seuil de détection des techniques commerciales, d'autres pouvant avoir quelques blips de réplication transitoires.

Dans ce contexte, certains patients HICs ont une baisse progressive de leur taux de LT CD4, ainsi qu'une activation immunitaire T CD4 et T CD8 supérieure à celle de personnes non infectées.

Au cours de nos travaux, nous nous sommes ainsi interrogés sur les points suivants :

- 1) Chez les patients HIV controllers, existe-t'il des biomarqueurs plasmatiques témoignant d'une inflammation systémique anormale ? Si oui, ces biomarqueurs sont-ils associés à des mécanismes physiopathologiques spécifiques à étudier ?
- 2) Cette activation immunitaire est-elle associée à la mise en route de la voie de l'Interféron ?
- 3) Chez les patients HIV controllers présentant une baisse significative de leurs LT CD4 ou perdant le contrôle antiviral au cours de leur suivi, existe-t'il des événements cliniques ou immunologiques déterminants ?

RESULTATS

TRAVAIL N°1 – Elevated IP10 levels are associated with immune activation and low CD4 T cell counts in HIV controller patients

Nicolas Noel, Faroudy Boufassa, Camille Lécroux, Asier Sáez-Cirión, Christine Bourgeois, Catherine Dunyach-Remy, Cécile Goujard, Christine Rouzioux, Laurence Meyer, Gianfranco Pancino, Alain Venet, Olivier Lambotte and the ANRS C021 CODEX study group

Article publié dans *AIDS* (Noel N et al., *AIDS* 2014;28:467-76)

Dans un premier temps, nous avons voulu étudier s'il existait une élévation anormale de biomarqueurs plasmatiques associés à l'inflammation systémique ou à l'activation immunitaire chez les patients HIV controllers de la cohorte CODEX.

Pour ce faire, nous avons analysé les taux de certaines cytokines et chimiokines circulantes (TNF α , IL6, IL10, MCP1, IP10, CD14 soluble, CD163 soluble) en technique multiplex (FlowCytoMix*, eBioscience™) et en ELISA (R&D systems™, eBioscience™). Les patients étudiés étaient : les patients HIV controllers de la cohorte CODEX (n=70, définis par un suivi d'au moins 5 ans avec les 5 dernières CV < 400 copies/mL sans traitement) comparés à des patients virémiques (n=33, CV > 10000 copies/mL sans traitement) et à des patients contrôlant le virus sous traitement antirétroviral efficace (n=30, CV < 40 copies/mL depuis au moins 2 ans sans ARV), ainsi qu'à des témoins sains. Par ailleurs, nous nous sommes intéressés à étudier si cette inflammation était différente selon que les HICs avaient toujours eu des charges virales indétectables (« elite controllers ») ou qu'ils avaient eu des blips de réplication virale détectable.

Nous avons étudié les 70 premiers patients inclus dans CODEX, pour lesquels les plasmas à l'inclusion dans la cohorte ainsi qu'à M12, et pour 40 d'entre eux à M24, étaient disponibles afin d'analyser l'évolution dans le temps des paramètres inflammatoires. Enfin, nous avons mis en perspective les données d'inflammation

obtenues avec les paramètres immuno-virologiques (LT CD4 circulants, CV en ARN et taux d'ADN VIH cellulaire) et l'activation lymphocytaire T CD4 et CD8.

Les principaux résultats ont été les suivants :

- (i) les HICs, qu'ils soient elite ou non, avaient des taux d'IP10 et de $\text{TNF}\alpha$ plus élevés que les témoins sains. Par ailleurs, les patients HICs avec des antécédents de blips avaient des taux de CD14 solubles plus élevés que les témoins sains. Les taux de $\text{TNF}\alpha$ et de CD14s étaient similaires à ceux des patients virémiques ou contrôlés sous ARV. Les taux d'IL6 et d'IL10 étaient inférieurs à ceux des virémiques et des patients sous ARV, et aucune différence n'était observée pour les taux de CRP ultra-sensible ou CD163 soluble entre les différents groupes de patients infectés.
- (ii) IP10 était le seul biomarqueur dont les taux étaient différents à la fois des témoins sains et des patients virémiques, et ses taux chez les HICs étaient stables dans le temps (à 1 et 2 ans après inclusion)
- (iii) les biomarqueurs d'inflammation n'étaient pas corrélés à la charge virale ultra-sensible chez les HICs, mais plusieurs d'entre eux étaient associés aux paramètres d'activation des LT CD4 et CD8 (IP10, IL6, CD163s)
- (iv) chez les HICs, les taux d'IP10 à l'inclusion étaient négativement corrélés aux taux de LT CD4 à l'inclusion, mais également à 1 et 2 ans post-inclusion

Elevated IP10 levels are associated with immune activation and low CD4⁺ T-cell counts in HIV controller patients

Nicolas Noel^{a,b}, Faroudy Boufassa^c, Camille Lécuroux^a,
Asier Saez-Cirion^d, Christine Bourgeois^a, Catherine Dunyach-Remy^{e,f},
Cécile Goujard^{b,c,g}, Christine Rouzioux^h, Laurence Meyer^c,
Gianfranco Pancino^d, Alain Venet^a, Olivier Lambotte^{a,b,g},
the ANRS C021 CODEX Study Group

Background: Although HIV controllers (HICs) achieve long-term control of viremia in the absence of antiretroviral therapy (ART), they display marked immune activation. The levels of inflammatory biomarkers in HICs and the biomarkers' relationships with immunologic and virologic status have yet to be fully characterized.

Design: A cohort study.

Methods: Plasma levels of seven biomarkers [tumor necrosis factor (TNF) α , interleukin (IL)6, IL10, interferon gamma-induced protein 10 (IP10), monocyte chemoattractant protein-1 (MCP1), soluble CD14 (sCD14), soluble CD163 (sCD163)] were compared in 70 HICs, 33 HIV-1-infected, treatment-naïve noncontrollers (viremic patients), 30 ART-treated patients and 40 healthy donors. In HICs, we investigated the interplay between biomarkers, cell activation and the CD4⁺ T-cell count.

Results: HICs had higher levels of IP10, TNF α and sCD14 than healthy donors did ($P < 0.01$ for each). Also, TNF α and sCD14 levels of the HICs were similar to those measured in viremic and ART-treated patients. However, the levels of IL6 and IL10 were significantly lower in HICs than in viremic or ART-treated patients. In HICs, only IP10 levels differed significantly from those in both healthy donors and viremic patients, and were positively correlated with the expression of CD8⁺ and CD4⁺ T-cell activation markers. The IP10 levels of HICs were still elevated 12 and 24 months after the initial assay. Lastly, IP10 levels at enrollment were negatively correlated with the CD4⁺ T-cell count at enrollment and 12 months later.

Conclusion: HICs display a number of inflammatory features associated with persistent T-cell immune activation. © 2014 Wolters Kluwer Health | Lippincott Williams & Wilkins

AIDS 2014, **28**:467–476

Keywords: activation, antiretroviral treatment, biomarkers, HIV controllers, IP10

^aINSERM U1012, Régulation de la réponse immune, infection VIH1 et autoimmunité, Université Paris Sud, ^bAPHP, Service de Médecine Interne, Hôpitaux Universitaires Paris Sud, ^cINSERM U1018, Centre de recherche en Epidémiologie et Santé des Populations, Université Paris Sud, Le Kremlin Bicêtre, ^dInstitut Pasteur, Unité de régulation des infections rétrovirales, Paris, ^eService de Microbiologie, CHU Carémieu, ^fINSERM U1047, Centre National de Référence des Brucella (L.A.), UFR de Médecine Université Montpellier 1, Nîmes, ^gFaculté de Médecine Paris Sud XI, Le Kremlin Bicêtre, and ^hAPHP, Laboratoire de Virologie, CHU Necker, Paris, France.

Correspondence to Professor Olivier Lambotte, MD, PhD, Service de Médecine Interne, CHU Bicêtre, 78 rue du Général Leclerc, F-94275 Le Kremlin Bicêtre Cedex, France.

Tel: +33 145 212 783; fax: +33 145 212 733; e-mail: olivier.lambotte@bct.aphp.fr

Received: 16 August 2013; revised: 3 December 2013; accepted: 3 December 2013.

DOI:10.1097/QAD.0000000000000174

Introduction

HIV controllers (HICs) are rare, HIV-1-infected patients who display long-term spontaneous control of viremia [1–3]. The mechanisms of viral control are incompletely understood. Most HICs are infected with replication-competent viruses [4]. The patient's genetic background probably influences the control of the virus, since the human leucocyte antigen (HLA)-B57 and B27 alleles are over-represented in HICs [2,5]. Controllers exhibit strong antiviral immune responses, which are mediated by polyfunctional CD8⁺ T cells [6–9]. However, HIV-specific CD8⁺ and CD4⁺ T-cell responses are not detected in all HICs [3,10,11]. Some HICs exhibit a decline in their CD4⁺ T-cell count or loss of the ability to control HIV, which may be subtended by excessive immune activation [12–14]. Indeed, HICs have higher proportions of activated HLA-DR⁺/CD38⁺ CD8⁺ T cells than healthy donors or patients on antiretroviral therapy (ART) do [14]. This could be related to the persistence of extremely low levels of HIV replication that can be detected using ultrasensitive techniques [15], excessive microbial translocation [16] or other as-yet unknown mechanisms.

Immune activation and the associated systemic inflammation are hallmarks of the HIV disease process [17]. Given that detailed flow cytometry analyses of HIV-infected patients are not performed on a routine basis, researchers have sought to define blood biomarker levels that define an individual's activation profile. Abnormally high levels of inflammatory and coagulation biomarkers [such as high-sensitivity C-reactive protein (hsCRP), interleukin (IL)6 and D-dimers] are associated with immunological failure, clinical morbidity and AIDS and non-AIDS-related mortality [18,19]. Levels of interferon gamma-induced protein 10 (IP10), soluble CD14 (sCD14), tumor necrosis factor (TNF) α , IL10 and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP1) have been variously linked to a low CD4⁺ T-cell count [20–23], viral replication [23–25], atherosclerosis [26], cognitive impairment [27] and mortality [28].

The few studies to have focused on the role of circulating cytokines and chemokines in HICs have yielded contrasting results. Hsue *et al.* [29] found higher levels of hsCRP in 33 HICs than in healthy donors, and Pereyra *et al.* [30] found high sCD163, sCD14 and IP10 levels in 10 elite controller patients. Both studies reported an increased risk of atherosclerosis in HICs. However, a recent study found that IP10 and MCP1 levels in 18 HICs were similar to those seen in 13 healthy donors [31].

Here, we assayed plasma biomarkers in 70 patients from the Agence Nationale de Recherche sur le SIDA et les hépatites virales (ANRS) HIC cohort and for whom at least two consecutive samples (at enrollment and 1 year later) were available. This constitutes the largest group of HICs in whom soluble biomarkers have been quantified

to date. The HICs were compared with treatment-naïve viremic noncontrollers, aviremic ART-treated patients and healthy donors. We particularly studied changes over time in the cytokine and chemokine levels of the HICs and the latter's relationships with CD4⁺ T-cell counts.

Methods

Patients and study design

The study population comprised of 70 HICs from the ANRS CO21 COHorte Des EXtrêmes (CODEX) cohort. These ART-naïve patients had been diagnosed at least 5 years previously and had displayed viral loads below 400 copies/ml in the last five consecutive measurements. Individuals whose viral loads had never exceeded 50 RNA copies/ml were referred to as elite controllers ($n = 22$) [12]. All patients gave their informed consent to participation in the study. The study protocol was approved by the regional investigational review board (Comité de Protection des Personnes Ile-de-France VII, Paris, France; approval reference: 05–22) and performed in compliance with the tenets of the Declaration of Helsinki. Patients are followed every 12 months with plasma samples collected at each study visit and stored at -80°C .

The control groups consisted of 33 viremic (viral load $>10\,000$ copies/ml), treatment-naïve patients (viremic patients); 30 ART-treated patients with no detectable viral load (<40 copies/ml) for at least 2 years (ART-treated patients); and 40 healthy donors for whom blood samples were available for research purposes (stored at the Etablissement Français du Sang, Paris, France).

The data collected from the 70 HICs at enrollment (day 0) were then compared with the samples obtained 12 months later. In 40 HICs, a sample obtained at 24 months was also available.

Data collection

Cytokine and chemokine measurements

The eight assayed soluble proteins were chosen for their inflammatory properties (TNF α , IL6, hsCRP, IP10), anti-inflammatory properties (IL10) or relationship with monocyte activation (MCP1, sCD14, sCD163) during HIV infection [14–25].

Levels of TNF α , IL6, IP10, MCP1 and IL10 were measured in a FlowCytomix bead-based multiplex immunoassay (eBioscience Inc., San Diego, California, USA), according to the manufacturer's instructions. Given that the IL6 level in over half the samples was below the assay's limit of detection, this interleukin was assayed with a specific ELISA (Human IL6 Platinum ELISA; eBioscience). We also used ELISAs to measure levels of hsCRP (CRP Gen.3 kit; Roche Diagnostics, Indianapolis, Indiana, USA), soluble CD14 and soluble CD163 (R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, USA).

Flow cytometry analysis

Surface expression of T-lymphocyte activation markers (HLA-DR and CD38⁺) was analyzed by flow cytometry of the HIC whole blood samples, as described elsewhere [10].

Human leukocyte antigen typing and the HIV-specific CD8⁺ T-cell response

Human leukocyte antigen typing was based on the complement-dependent microlymphocytotoxic technique (InGen Biosciences, France). Interferon-gamma (IFN- γ) ELISpot assays were used to measure specific responses to peptides corresponding to optimal HIV-cytotoxic T lymphocytes epitopes (National Institutes of Health HIV Molecular Immunology Database: http://www.hiv.lanl.gov/content/immunology/tables/optimal_ctl_summary.html) according to the patients' HLA type. Optimal peptides were used at 2 μ g/ml in pools according to the HLA allele and to the HIV protein and were tested in duplicate. Data were expressed as spot-forming cells (SFCs) per 10⁶ peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). Results were considered positive if more than 50 SFCs/10⁶ PBMCs after subtraction of the mean background were obtained with cells alone.

Statistical analyses

Data are expressed as the median (1st–3rd quartile) for continuous variables, and *n* (%) for categorical variables. Given their distribution, the cytokine/chemokine levels in the different groups were compared across the groups by using a nonparametric Kruskal–Wallis test. In order to take into account the risk of false discovery due to multiple comparisons, Dunn's test correction was used for the comparisons between the different groups. A chi-square test was used to compare categorical data. In HICs, changes over time in cytokine levels [from M0 to month 12 (M12) and month 24 (M24)] were analyzed in a Wilcoxon rank-sum test for matched pairs. Spearman's

coefficient was used for correlation analyses after log₁₀-normalization of non-normally distributed datasets. The threshold for statistical significance was set to *P* less than 0.05 for all analyses. Data were stored and analyzed using PRISM software (version 5; GraphPad Software, La Jolla, California, USA).

Results

Characteristics of the study population

The characteristics of the four study groups are summarized in Table 1. The 70 HICs were monitored over a median (1st–3rd quartile) period of 12 (8–15) years after HIV diagnosis. The 22 HICs (32.4%) classified as elite controllers were monitored over a median [interquartile range (IQR)] period of 11 (7.5–15) years after HIV diagnosis. The elite controllers differed significantly from the other HICs in terms of ultra-sensitive HIV RNA viral load at enrollment [4 (4–12) vs. 76 (25–285) copies/ml, respectively; *P* < 0.0001], but not for cellular HIV DNA copy number [24 (11.8–50.3) vs. 33.5 (19.0–128.5) copies/10⁶ PBMCs, respectively; *P* = 0.17]. The elite controllers had a less profound CD4⁺ T-cell nadir (lowest CD4⁺ T-cell count reported) than the nonelite controllers did [median (IQR) counts: 462.5 (427.3–672.8) vs. 384.5 (299–504.3), respectively; *P* = 0.02], in accordance with previous studies [12]. The HLA B57 allele was present in 34.4% of the HIC population as a whole (with 41 vs. 31% in elite and nonelite controllers, respectively; *P* = 0.43).

Biomarker levels in HIV controllers

We first compared elite controllers and nonelite HICs with healthy donors. Elite controllers had higher levels of IP10 and TNF α (*P* < 0.01 for both) than healthy donors, and nonelite HICs had higher levels of IP10 (*P* < 0.001),

Table 1. Characteristics of the study groups.

| Patients | HICs (<i>n</i> = 70) | Aviremic ART-treated patients (<i>n</i> = 30) | Viremic treatment-naïve patients (<i>n</i> = 33) | HDs (<i>n</i> = 40) |
|---|--------------------------|--|---|-------------------------|
| Age (years) | 45.5 (38.5–51.3) | 49.7 (45.1–55.3)* | 42.8 (34.3–46.9) | 37.5 (32–48.8) |
| Male (<i>n</i> , %) | 35 (50) | 19 (63.3) | 21 (63.6) | 21 (52.5) |
| HCV+ (<i>n</i> , %) | 5 (7.1) | 2 (6.7) | 2 (6.1) | 0 (0) |
| Lowest CD4 ⁺ T-cell count since HIV diagnosis (nadir) (cells/ μ l) ^a | 426.5 (328–565.8) | 152 (62.5–241) | 286 (156.5–413) | – |
| CD4 ⁺ T-cell count at enrollment (cells/ μ l) | 649 (467–914) | 620.5 (445.5–775.5) | 324 (156.5–486.5) | 1120 (757–1439) |
| % CD4 ⁺ at enrollment | 35 (28–42) | 29 (24–36.5) | 15.5 (8.5–24.3) | – |
| Plasma HIV RNA VL at enrollment (copies/ml) | <40 (<40–139) | <40 (<40–<40) | 53703 (30496– 474650) | – |
| Ultrasensitive HIV RNA VL (copies/ml) at enrollment | 31.5 (5–176.3) | – | – | – |
| Cellular HIV DNA VL (copies/10 ⁶ PBMCs) at enrollment | 32 (18.3–91) | – | – | – |

ART, antiretroviral therapy; HCV, hepatitis C virus; HDs, healthy donors; HICs, HIV controllers; VL, viral load. Results are expressed as the median [IQR] or *n* (%), as applicable.

^aThe lowest CD4⁺ cell count in the absence of ART.

*,***P* < 0.01 for ART vs. HDs and ART vs. viremic noncontrollers. No difference between HICs and the other groups.

TNF α ($P < 0.001$) and sCD14 ($P < 0.01$) than healthy donors (Fig. 1).

Next, we compared elite controllers and nonelite HICs with viremic patients. Levels of IP10, IL6 and the anti-

inflammatory cytokine IL10 were lower in both controller groups than in viremic patients. Furthermore, MCP1 levels were lower in elite controllers than in viremic patients. Neither group of HICs differed significantly from viremic patients in terms of sCD163 levels (Fig. 1). Given that the

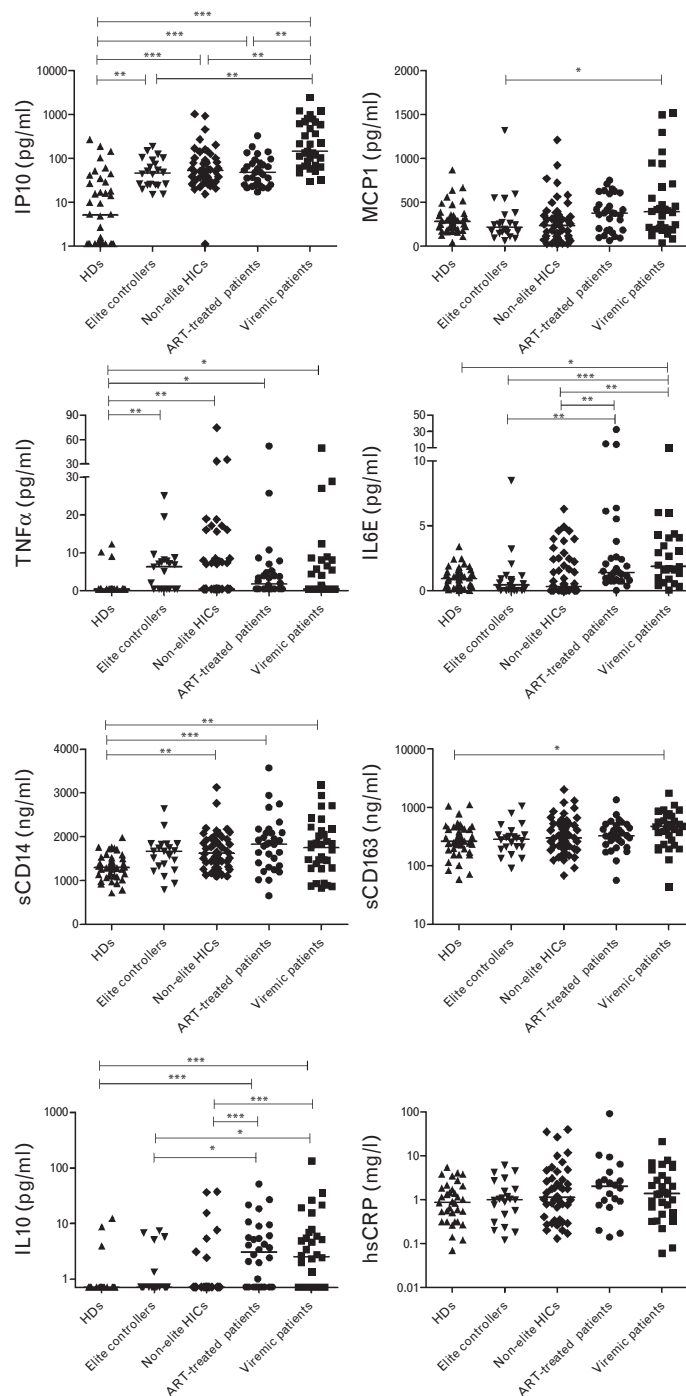


Fig. 1. Cytokine and chemokine levels in HDs, elite controllers (ECs), nonelite controllers (nonelite HICs), ART-treated patients and treatment-naïve, viremic, noncontroller patients. IP10, MCP1, TNF α and IL10 were detected using a multiplex bead assay (FlowCytomix*). IL6, sCD14, sCD163 and hsCRP were detected using ELISAs (see the Methods section). Intergroup comparisons were performed using a Kruskal–Wallis test, followed by Dunn’s post-test to take into account multiple comparisons. ART, antiretroviral therapy; HDs, healthy donors; HICs, HIV controllers; IL6, interleukin 6; TNF α , tumor necrosis factor alpha. (*) $P < 0.05$, (**) $P < 0.01$, (***) $P < 0.001$.

five study groups did not differ significantly (according to a Kruskal–Wallis test) in terms of hsCRP levels (low in all groups), this parameter was not analyzed further.

Interestingly, the levels of TNF α and sCD14 were similar in elite controllers, nonelite HICs and viremic patients (i.e. despite marked differences in the respective viral loads).

Finally, we focused our attention on similarities and disparities between elite controllers and ART-treated patients, as both groups do not experience detectable viral loads on long-term periods. Interestingly, elite controllers had similar levels of the vast majority of the biomarkers tested (IP10, MCP1, TNF α , sCD14, and sCD163) than ART-treated patients. Only IL6 and IL10 levels were lower in elite controllers than in ART-treated patients. Similar results were observed when comparing nonelite HICs with ART-treated patients, and there were no differences between elite controllers and nonelite controllers in terms of any of the cytokines.

In summary, these observations attest to the presence of inflammation in HICs, in the absence of marked viremia. Relative to healthy volunteers, IP10 and TNF α levels remained abnormally high in elite controllers (despite the absence of detectable viremic episodes in the latter).

Analysis of determinants of inflammatory biomarker levels in HIV controllers

No associations between biomarker levels on one hand and age, sex or hepatitis C status on the other were observed in any of the four study groups.

We then looked at whether prior immunologic damage might be associated with ongoing inflammation in HICs. The CD4⁺ T-cell nadir was significantly and negatively correlated with levels of IP10 ($r = -0.439$, $P = 0.0002$), sCD14 ($r = -0.243$, $P = 0.049$) and sCD163 ($r = -0.270$, $P = 0.027$) (Fig. 2a).

Furthermore, the CD4⁺ T-cell count at enrollment was negatively correlated with IP10 ($r = -0.387$, $P = 0.001$) and sCD163 ($r = -0.279$, $P = 0.019$), but not with sCD14 (Fig. 2b) or any of the other cytokines. Similar correlations were seen for the CD4⁺/CD8⁺ ratio at enrollment (IP10: $r = -0.410$, $P = 0.0007$; sCD163: $r = -0.280$, $P = 0.024$; sCD14: $r = -0.306$, $P = 0.014$), but not for the CD8⁺ T-cell count.

Given that the CD4⁺ T-cell count at enrollment was negatively correlated with the ultrasensitive RNA viral load ($r = -0.389$, $P = 0.002$), we then looked at whether the persistence of extremely low viral replication levels might influence biomarker levels. Interestingly, there were no associations between any of the cytokine levels (including IP10) and the viral load (whether measured as the ultrasensitive HIV RNA viral load or the cellular HIV DNA copy number), neither in HICs taken as a whole nor in elite controllers analyzed separately.

In summary, we found that systemic inflammation was associated with the CD4⁺ T-cell nadir and the CD4⁺ T-cell count at enrollment, but not with the ultrasensitive HIV RNA viral load.

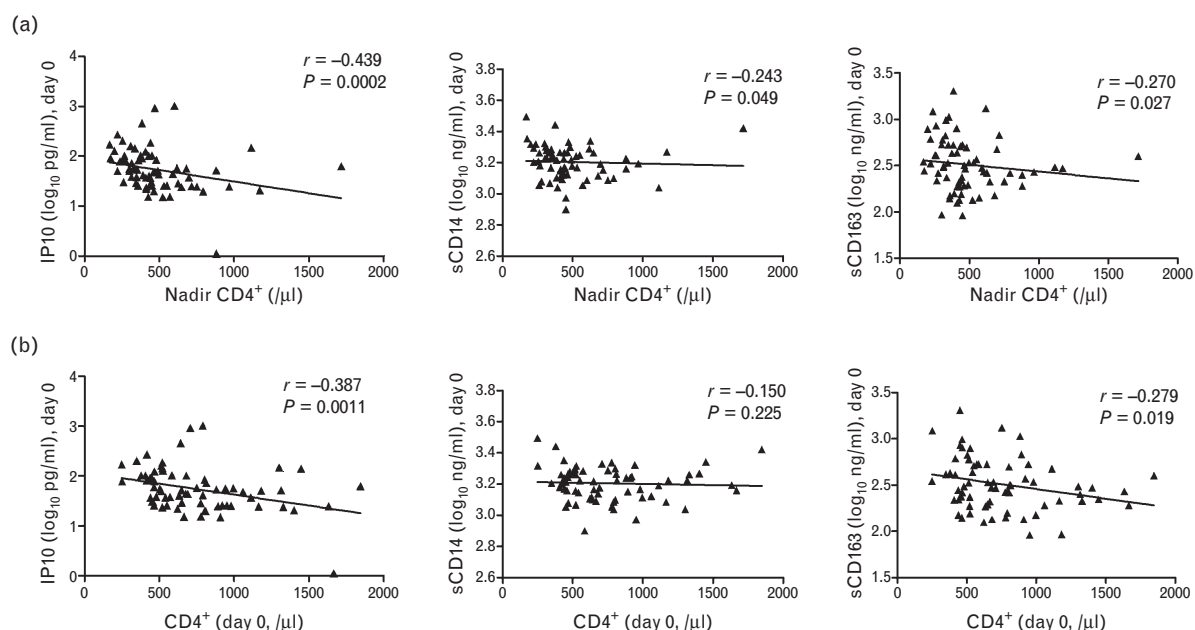


Fig. 2. Relationships between biomarkers and CD4⁺ T-cell counts in HICs. (a) Relationships between IP10, sCD163 and sCD14 levels (log₁₀ transformation) and the CD4⁺ T-cell nadir (cells/ μ l) in HICs. (b) Relationships between IP10, sCD163 and sCD14 levels (log₁₀ transformation) and the CD4⁺ T-cell count (cells/ μ l) at the same time point in HICs. HICs, HIV controllers.

Relationships with T-cell immune activation

Our data suggest that a very low viral load did not entirely account for cytokine/chemokine production. Therefore, we sought to analyze the relationships between biomarker levels and other immunologic parameters in HICs.

As shown in Fig. 3a and b, IP10, sCD163, IL6 and MCP1 levels were positively correlated with the proportion of HLA-DR⁺CD38⁺ activated CD8⁺

and CD4⁺ T cells in the group of HICs. No relationships between activated T-cell counts and the levels of sCD14, TNF α and IL10 were observed. In the subgroup of elite controllers, the proportion of activated CD8⁺ T cells was correlated with levels of IP10 ($r=0.453$, $P=0.045$), sCD163 ($r=0.640$, $P=0.002$) and MCP1 ($r=0.457$, $P=0.037$) (data not shown). There was a nonsignificant trend towards a correlation with IL6 levels ($r=0.398$, $P=0.082$).

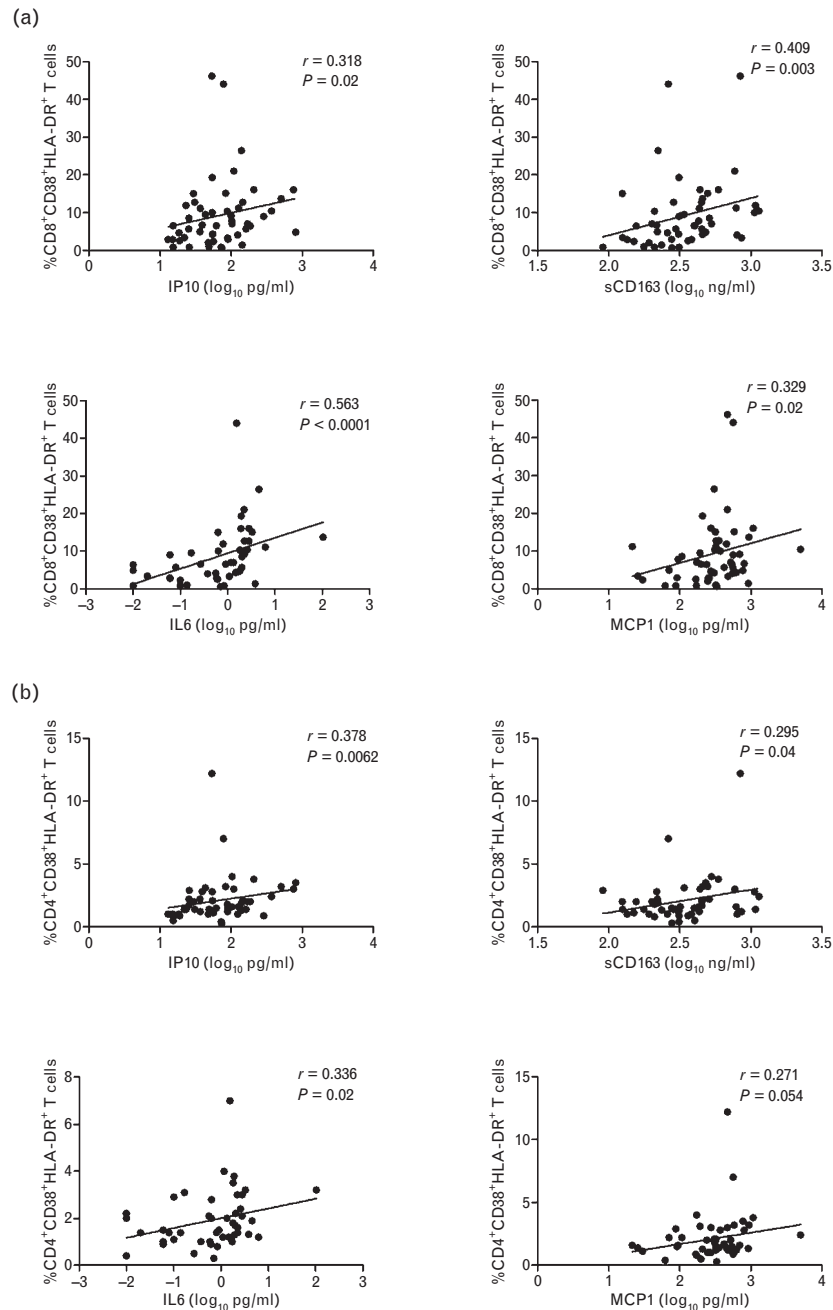


Fig. 3. Relationships between biomarkers and T-cell immune activation in HICs. (a) Relationships between IP10, sCD163, IL6 and MCP1 (log₁₀ transformation), and the proportion of HLA-DR⁺CD38⁺ CD8⁺ T cells in HICs. (b) Relationships between IP10, sCD163, IL6 and MCP1 (log₁₀ transformation) and the proportion of HLA-DR⁺CD38⁺ CD4⁺ T cells in HICs. HICs, HIV controllers; IL6, interleukin 6.

However, in elite controllers, there was no association with the proportion of HLA-DR⁺CD38⁺ CD4⁺ T cells.

There was no correlation between biomarker levels on one hand and the HIV-specific CD8⁺ T-cell frequency or the CD8⁺ cell ability to block viral replication on the other [10].

Lastly, we observed a positive correlation between IP10 and MCP1 levels (Spearman's $r=0.269$, $P=0.02$), between IP10 and sCD163 levels ($r=0.307$, $P=0.0099$) and between sCD14 and sCD163 levels ($r=0.385$, $P=0.001$) (Supplemental Figure 1, <http://links.lww.com/QAD/A463>); these correlations suggest the existence of links between the interferon pathway (IP10 and MCP1) and monocyte activation (sCD163 and sCD14) in HICs.

In summary, we found that the CD4⁺ and CD8⁺ T-cell activation levels were associated with systemic inflammation.

Evidence of persistent inflammation in HIV controllers

As described above, IP10 was the only biomarker associated with the following features: the CD4⁺ T-cell nadir, the CD4⁺ T-cell count at enrollment and T-lymphocyte activation. We therefore assessed the change over time in levels of this biomarker. The absence of any significant changes in IP10 levels from day 0 to M12 and M24 attested to the persistence of stable, chronic inflammation in HICs (Supplemental Figure 2, <http://links.lww.com/QAD/A463>).

We next investigated the interplay between IP10 levels on one hand and the dynamics of CD4⁺ T-cell counts at M12 and M24 on the other. At enrollment, higher IP10 levels correlated with a lower CD4⁺ T-cell count at M12 ($r=-0.41$, $P=0.0009$) and at M24 ($r=-0.38$, $P=0.019$) (Fig. 4).

Our results show that despite low levels of viral replication, IP10 levels remain abnormally high in HICs over time and are negatively correlated with the CD4⁺ T-cell count.

Discussion

In the present study, we analyzed levels of inflammatory chemokines (IP10, MCP1) and cytokines (TNF α , IL6), monocyte activation markers (sCD14, sCD163) and an anti-inflammatory cytokine (IL10) in a large cohort of HICs. The HICs had low-grade but detectable inflammation, with significantly higher levels of IP10, sCD14 and TNF α than in healthy donors. For IP10 and TNF α ,

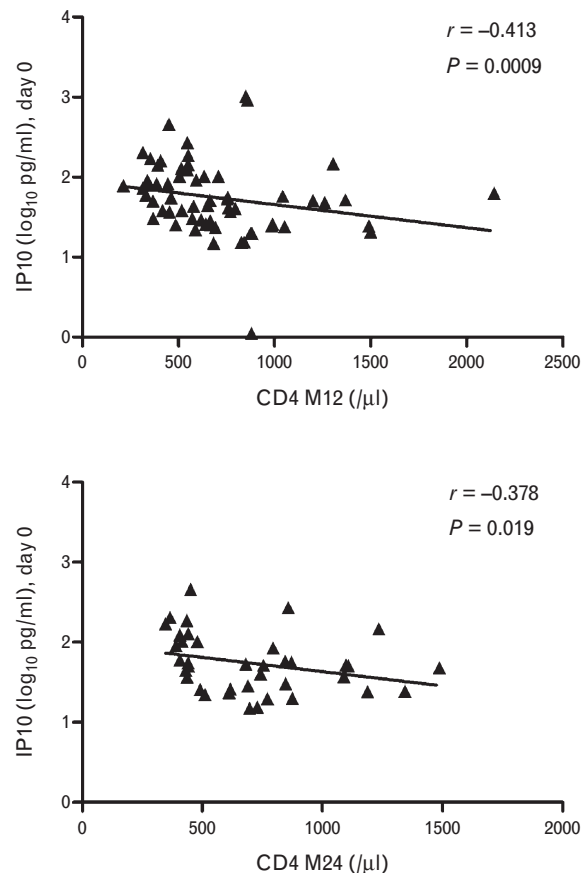


Fig. 4. Correlation between IP10 levels on day 0 and the CD4⁺ T-cell count (cells/μl) at M12 and M24 in HICs, HIV controllers.

we validated these data in elite controllers who had controlled viral replication without any blips for a median (IQR) duration of 11 (7.5–15) years. Levels of several biomarkers (IP10, MCP1, IL6 and IL10) were lower in both elite controllers and nonelite HICs, when compared with viremic patients. Moreover, biomarker levels were similar in the two groups of patients with undetectable viral loads (i.e. elite controllers and ART-treated patients), except that IL6 and IL10 levels were higher in ART-treated patients than in elite controllers. On this basis, we suggest that IP10 may have value as a surrogate marker of immune activation.

IP10 was the most discriminant inflammatory chemokine because its levels differed significantly when comparing HICs with both viremic patients and healthy donors. This observation raises questions about the factors that might contribute to production of this chemokine. Viral proteins such as gp120 [32] and Tat [33] might be trapped by follicular dendritic cells or macrophages in the lymph nodes, which would induce IP10 production by these cell types [34]. Low levels of viral replication could take place in lymphoid organs rather than in the peripheral blood [35]. Release of IFN γ and pro-inflammatory factors such as TNF α [33] might also

constitute stimuli for IP10 production; indeed, levels of TNF α were consistently elevated in the HICs studied here. IFN α can also participate in IP10 production [36,37]. In line with this hypothesis, we previously reported that HICs have fully functional plasmacytoid dendritic cells capable of producing large amounts of IFN α [38]. In summary, IP10 levels in HICs might depend (at least in part) on the history of viral control, enhanced inflammation (mediated by monocyte activation) and the IFN α / γ pathways.

The inflammation observed in HICs might conceivably be related to the persistence of extremely low levels of viral replication [15,39]. A true low-grade viral replication is supported by some studies which have shown evidence for HIV evolution [4,40–42]. However, some of our present observations weaken this hypothesis. Firstly, neither the ultrasensitive viral load nor the cellular HIV DNA levels correlated with biomarker levels. Secondly, we observed that TNF α and IP10 levels were persistently elevated in elite controllers (i.e. HICs who had kept their viral load below 50 copies/ml throughout the follow-up period). There were no significant differences between elite controllers and nonelite HICs in this respect.

Hence, factors other than residual viral replication are probably also involved. Here, we observed that IL6 and IL10 levels were higher in ART-treated patients than in both elite controllers and nonelite HICs. These differences might indirectly reflect more severe gut mucosa damage in ART-treated patients, who have a history of higher viral replication and lower CD4⁺ cell counts than HICs. Indeed, it has been reported that levels of circulating lipopolysaccharide (LPS) are higher in HICs and ART-treated patients than in healthy donors [14,16]. However, endotoxin-core antibody titers are higher in HICs than in ART-treated patients and are similarly low in ART-treated and viremic patients [16]. These observations suggest that neutralization of LPS' immunostimulatory effects might be more effective in HICs and might result in lower levels of inflammation in these patients. The higher IL10 levels in ART-treated patients might reflect their higher regulatory T-cell count (relative to HICs) [43].

Persistent monocyte activation might be also responsible for the elevated levels of IP10, TNF α and sCD14 observed in HICs [44]. In a study of a small number of elite controllers ($n = 10$), Pereyra *et al.* [30] suggested that monocyte-induced inflammation occurred in these individuals. Here, we observed positive correlations (between IP10 levels on one hand and MCP1 and sCD163 levels on the other) that also reflect monocyte activation. Furthermore, recent studies suggest that in the setting of HIV infection, TNF α may be produced by activated CD14⁺⁺CD16⁺ and CD14⁺CD16⁺⁺ monocytes [45]. The intensity and duration of previous viral replication – rather than ongoing viral production –

might account for this monocyte activation in HICs. In line with this, Ciccone *et al.* [46] reported that long-term non-progressors/elite controllers did not have evidence of gut mucosal depletion and had normal sCD14 levels relative to 9 healthy donors, whereas it was significantly higher in ART-controlled patients. Here, we also observed that elite controllers have similar sCD14 levels than healthy donors. However, as compared with healthy donors, sCD14 levels were higher in the 48 nonelite HICs and 30 ART-treated patients tested. Altogether, these findings suggest that previous history of blips in nonelite HICs might also partially account for monocyte activation and inflammation in some HICs, in a similar manner to pre-ART elevated viral loads observed in treated patients.

Low T-cell activation has been described in both ART-treated patients and HICs [14]. Here, we observed a link between immune activation in HICs (as measured by the proportion of HLA-DR⁺CD38⁺ CD8⁺ and CD4⁺ T cells) and their levels of IP10, sCD163, IL6 and MCP1. IP10, sCD14 and sCD163 levels were negatively associated with the nadir of the CD4⁺ T-cell count and high IP10 and sCD163 levels were associated with a low CD4⁺ T-cell count at enrollment. These findings extend previous observations whereby prolonged immune activation in HICs correlates with a decline in the CD4⁺ T-cell count [14]. In our study, IP10 and sCD163 were significantly correlated with both immune activation and a low CD4⁺ T-cell count. Interestingly, Liovat *et al.* [21] recently reported that elevated IP10 levels during primary infection were predictive of rapid CD4⁺ T-cell decline at M6. Moreover, the levels of the monocyte activation marker sCD163 are elevated in early-stage and chronic HIV infections and have been linked to immune activation and variations in the CD4⁺ T-lymphocyte count in non-HICs [26].

Here, we showed that in HICs, IP10 levels remained abnormally high over 12 and 24 months and were associated with low CD4⁺ T-cell counts at M12 and M24. This may have long-term immunological consequences. However, a direct link between the intensity of this inflammation and the time course of the CD4⁺ T-cell count in HICs remains to be confirmed. A multivariate analysis would have helped to determine the independent effect of IP10 in disease progression in HICs, taking into account nadir CD4⁺ cell count. However, only eight of the 70 patients displayed a clinically relevant CD4⁺ T-cell decline (i.e. changing from >500/ μ l at enrollment to <500/ μ l) after 1 year of follow-up. This is in line with previous publications showing that HICs have a slow rate of disease progression [12]. In such patients, a longer follow-up is needed to disentangle this important issue.

In addition to chronic inflammation and T-lymphocyte activation, several additional factors determine the change

over time in CD4⁺ T-cell counts in HICs. Persistent, low-grade viral replication and a history of viral load blips are involved, as reported previously [12]. Hence, elite controllers have significantly lower ultrasensitive HIV viral loads and higher CD4⁺ T-cell counts than nonelite controllers do [12]. Depressed lymphopoiesis may also contribute to changes of CD4⁺ T-cell counts in some HICs [47]. Lastly, microbial translocation may also have a role in HICs. We observed a negative correlation between the levels of circulating bacterial 16S rDNA and the CD4⁺ T-cell count in the 70 HICs studied here (data not shown). However, the absence of correlations between microbial translocation on one hand, and neither the biomarkers nor the HIV viral load measurements on the other, suggests that other unidentified pathways are involved.

Lastly, the persistent, low-grade inflammation seen in HICs may also have long-term clinical consequences, such as coronary artery disease or cognitive impairment. Sub-clinical atherosclerosis has already been documented in a small number of HICs [29,30] and IP10 has been linked to atherogenesis [48]. hsCRP has been associated with cardiovascular events, but we did not find any difference in hsCRP levels when comparing the various patient groups and healthy donors. This apparent difference with the findings of the Strategies for Management of Antiretroviral Therapy (SMART) and Flexible Initial Retrovirus Suppressive Therapies (FIRST) studies [18,19] might be due to the number of patients included in our study and in these trials. Furthermore, such results regarding hsCRP have already been reported (i.e. no difference between infected patients and healthy donors in [49] and no difference between viremic patients, HICs and healthy donors in [30]).

In conclusion, we performed the largest study of inflammation biomarker levels in HICs. We found that HICs have elevated levels of IP10, TNF α and sCD14. This chronic inflammation might result from abnormal monocyte activation (TNF α and sCD14) and dysregulation of the IFN α / γ pathways (IP10). Of the various biomarkers studied here, IP10 seems to be the most discriminant biomarker in HICs (relative to both healthy donors and viremic noncontrollers), and its high levels may be related to low CD4⁺ T-cell counts. Monitoring of CD4⁺ T-cell count, the ultrasensitive viral load and IP10 levels might enable the detection of HICs at risk of disease progression and/or non-AIDS-related events.

Acknowledgements

The authors thank Stéphane Hua, Isabelle Girault and Dr Jean-Philippe Lavigne for technical support and helpful comments; Marc Conti (Service de Biochimie, CHU Henri Mondor, APHP, Créteil, France) for hsCRP assays;

David Fraser for language editing; all patients for their cooperation and all physicians who cared for patients in the ANRS HIV controller cohort.

The steering committee of the ANRS CO21 study group: Henri Agut, Brigitte Autran, Faroudy Boufassa, Dominique Costagliola, Olivier Lambotte, Laurence Meyer, Gianfranco Pancino, Christine Rouzioux, Ioannis Theodorou, Alain Venet.

Funding statement: N.N. received a PhD fellowship from the *Fondation pour la Recherche Médicale* (FRM). This work was funded by the *Agence pour la Recherche Contre le SIDA* (ANRS), INSERM and Paris-Sud University.

Conflicts of interest

There are no conflicts of interest.

References

1. Lambotte O, Boufassa F, Madec Y, Nguyen A, Goujard C, Meyer L, *et al.* **HIV controllers: a homogeneous group of HIV-1-infected patients with spontaneous control of viral replication.** *Clin Infect Dis* 2005; **41**:1053–1056.
2. Deeks SG, Walker BD. **Human immunodeficiency virus controllers: mechanisms of durable virus control in the absence of antiretroviral therapy.** *Immunity* 2007; **27**:406–416.
3. Emu B, Sinclair E, Favre D, Moretto WJ, Hsue P, Hoh R, *et al.* **Phenotypic, functional, and kinetic parameters associated with apparent T-cell control of human immunodeficiency virus replication in individuals with and without antiretroviral treatment.** *J Virol* 2005; **79**:14169–14178.
4. Lamine A, Caumont-Sarcos A, Chaix M-L, Saez-Cirion A, Rouzioux C, Delfraissy J-F, *et al.* **Replication-competent HIV strains infect HIV controllers despite undetectable viremia (ANRS EP36 study).** *AIDS* 2007; **21**:1043–1045.
5. Sáez-Cirión A, Pancino G, Sinet M, Venet A, Lambotte O. **HIV controllers: how do they tame the virus?** *Trends Immunol* 2007; **28**:532–540.
6. Sáez-Cirión A, Lacabaratz C, Lambotte O, Versmisse P, Urrutia A, Boufassa F, *et al.* **HIV controllers exhibit potent CD8 T cell capacity to suppress HIV infection ex vivo and peculiar cytotoxic T lymphocyte activation phenotype.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; **104**:6776–6781.
7. Migueles SA, Osborne CM, Royce C, Compton AA, Joshi RP, Weeks KA, *et al.* **Lytic granule loading of CD8⁺ T cells is required for HIV-infected cell elimination associated with immune control.** *Immunity* 2008; **29**:1009–1021.
8. Ndhlovu ZM, Chibnik LB, Proudfoot J, Vine S, McMullen A, Cesa K, *et al.* **High-dimensional immune monitoring models of HIV-1-specific CD8 T cell responses accurately identify subjects achieving spontaneous viral control.** *Blood* 2013; **121**:801–811.
9. Betts MR, Nason MC, West SM, De Rosa SC, Migueles SA, Abraham J, *et al.* **HIV nonprogressors preferentially maintain highly functional HIV-specific CD8⁺ T cells.** *Blood* 2006; **107**:4781–4789.
10. Sáez-Cirión A, Sinet M, Shin SY, Urrutia A, Versmisse P, Lacabaratz C, *et al.* **Heterogeneity in HIV suppression by CD8 T cells from HIV controllers: association with Gag-specific CD8 T cell responses.** *J Immunol* 2009; **182**:7828–7837.
11. Pereyra F, Addo MM, Kaufmann DE, Liu Y, Miura T, Rathod A, *et al.* **Genetic and immunologic heterogeneity among persons who control HIV infection in the absence of therapy.** *J Infect Dis* 2008; **197**:563–571.
12. Boufassa F, Saez-Cirion A, Lechenadec J, Zucman D, Avettand-Fenoel V, Venet A, *et al.* **CD4 dynamics over a 15 year-period among HIV controllers enrolled in the ANRS French observatory.** *PLoS One* 2011; **6**:e18726.

13. Okulicz JF, Marconi VC, Landrum ML, Wegner S, Weintrob A, Ganesan A, *et al.* **Clinical outcomes of elite controllers, viremic controllers, and long-term nonprogressors in the US Department of Defense HIV natural history study.** *J Infect Dis* 2009; **200**:1714–1723.
14. Hunt PW, Brechley J, Sinclair E, McCune JM, Roland M, Page-Shafer K, *et al.* **Relationship between T cell activation and CD4+ T cell count in HIV-seropositive individuals with undetectable plasma HIV RNA levels in the absence of therapy.** *J Infect Dis* 2008; **197**:126–133.
15. Hatano H, Delwart EL, Norris PJ, Lee T-H, Dunn-Williams J, Hunt PW, *et al.* **Evidence for persistent low-level viremia in individuals who control human immunodeficiency virus in the absence of antiretroviral therapy.** *J Virol* 2009; **83**:329–335.
16. Brechley JM, Price DA, Schacker TW, Asher TE, Silvestri G, Rao S, *et al.* **Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection.** *Nat Med* 2006; **12**:1365–1371.
17. Rodger AJ, Fox Z, Lundgren JD, Kuller LH, Boesecke C, Gey D, *et al.* **Activation and coagulation biomarkers are independent predictors of the development of opportunistic disease in patients with HIV infection.** *J Infect Dis* 2009; **200**:973–983.
18. Kuller LH, Tracy R, Belloso W, De Wit S, Drummond F, Lane HC, *et al.* **Inflammatory and coagulation biomarkers and mortality in patients with HIV infection.** *PLoS Med* 2008; **5**:e203.
19. Boulware DR, Hulsiek KH, Puroon CE, Rupert A, Baker JV, French MA, *et al.* **Higher levels of CRP, D-dimer, IL-6, and hyaluronic acid before initiation of antiretroviral therapy (ART) are associated with increased risk of AIDS or death.** *J Infect Dis* 2011; **203**:1637–1646.
20. Stylianou E, Aukrust P, Bendzen K, Müller F, Frøland SS. **Interferons and interferon (IFN)-inducible protein 10 during highly active antiretroviral therapy (HAART)-possible immunosuppressive role of IFN-alpha in HIV infection.** *Clin Exp Immunol* 2000; **119**:479–485.
21. Liovat A-S, Rey-Cuillé M-A, Lécroux C, Jacquelin B, Girault I, Petitjean G, *et al.* **Acute plasma biomarkers of T cell activation set-point levels and of disease progression in HIV-1 infection.** *PLoS One* 2012; **7**:e46143.
22. Lederman MM, Calabrese L, Funderburg NT, Clagett B, Medvik K, Bonilla H, *et al.* **Immunologic failure despite suppressive antiretroviral therapy is related to activation and turnover of memory CD4 cells.** *J Infect Dis* 2011; **204**:1217–1226.
23. Marchetti G, Cozzi-Lepri A, Merlini E, Bellistri GM, Castagna A, Galli M, *et al.* **Microbial translocation predicts disease progression of HIV-infected antiretroviral-naïve patients with high CD4+ cell count.** *AIDS* 2011; **25**:1385–1394.
24. Cozzi-Lepri A, French MA, Baxter J, Okhuysen P, Plana M, Neuhaus J, *et al.* **Resumption of HIV replication is associated with monocyte/macrophage derived cytokine and chemokine changes: results from a large international clinical trial.** *AIDS* 2011; **25**:1207–1217.
25. Lane BR, King SR, Bock PJ, Strieter RM, Coffey MJ, Markovitz DM. **The C-X-C chemokine IP-10 stimulates HIV-1 replication.** *Virology* 2003; **307**:122–134.
26. Burdo TH, Lo J, Abbata S, Wei J, DeLelys ME, Preffer F, *et al.* **Soluble CD163, a novel marker of activated macrophages, is elevated and associated with noncalcified coronary plaque in HIV-infected patients.** *J Infect Dis* 2011; **204**:1227–1236.
27. Lyons JL, Uno H, Ancuta P, Kamat A, Moore DJ, Singer EJ, *et al.* **Plasma sCD14 is a biomarker associated with impaired neurocognitive test performance in attention and learning domains in HIV infection.** *J Acquir Immune Defic Syndr* 2011; **57**:371–379.
28. Sandler NG, Wand H, Roque A, Law M, Nason MC, Nixon DE, *et al.* **Plasma levels of soluble CD14 independently predict mortality in HIV infection.** *J Infect Dis* 2011; **203**:780–790.
29. Hsue PY, Hunt PW, Schnell A, Kalapus SC, Hoh R, Ganz P, *et al.* **Role of viral replication, antiretroviral therapy, and immunodeficiency in HIV-associated atherosclerosis.** *AIDS* 2009; **23**:1059–1067.
30. Pereyra F, Lo J, Triant VA, Wei J, Buzon MJ, Fitch KV, *et al.* **Increased coronary atherosclerosis and immune activation in HIV-1 elite controllers.** *AIDS* 2012; **26**:2409–2412.
31. Card CM, Keynan Y, Lajoie J, Bell CP, Dawood M, Becker M, *et al.* **HIV controllers are distinguished by chemokine expression profile and HIV-specific T-cell proliferative potential.** *J Acquir Immune Defic Syndr* 2012; **59**:427–437.
32. Asensio VC, Maier J, Milner R, Boztug K, Kincaid C, Moulard M, *et al.* **Interferon-independent, human immunodeficiency virus type 1 gp120-mediated induction of CXCL10/IP-10 gene expression by astrocytes in vivo and in vitro.** *J Virol* 2001; **75**:7067–7077.
33. Williams R, Yao H, Dhillon NK, Buch SJ. **HIV-1 Tat co-operates with IFN-gamma and TNF-alpha to increase CXCL10 in human astrocytes.** *PLoS One* 2009; **4**:e5709.
34. Liu M, Guo S, Hibbert JM, Jain V, Singh N, Wilson NO, *et al.* **CXCL10/IP-10 in infectious diseases pathogenesis and potential therapeutic implications.** *Cytokine Growth Factor Rev* 2011; **22**:121–130.
35. North TW, Higgins J, Deere JD, Hayes TL, Villalobos A, Adamson L, *et al.* **Viral sanctuaries during highly active antiretroviral therapy in a nonhuman primate model for AIDS.** *J Virol* 2010; **84**:2913–2922.
36. Blackwell SE, Krieg AM. **CpG-A-induced monocyte IFN-gamma-inducible protein-10 production is regulated by plasmacytoid dendritic cell-derived IFN-alpha.** *J Immunol* 2003; **170**:4061–4068.
37. Hardy GAD, Sieg S, Rodriguez B, Anthony D, Asaad R, Jiang W, *et al.* **Interferon-(is the primary plasma type-I IFN in HIV-1 infection and correlates with immune activation and disease markers.** *PLoS One* 2013; **8**:e56527.
38. Barblu L, Machmach K, Gras C, Delfraissy J-F, Boufassa F, Leal M, *et al.* **Plasmacytoid dendritic cells (pDCs) from HIV controllers produce interferon-(and differentiate into functional killer pDCs under HIV activation.** *J Infect Dis* 2012; **206**:790–801.
39. Pereyra F, Palmer S, Miura T, Block BL, Wiegand A, Rothchild AC, *et al.* **Persistent low-level viremia in HIV-1 elite controllers and relationship to immunologic parameters.** *J Infect Dis* 2009; **200**:984–990.
40. Bailey JR, Williams TM, Siliciano RF, Blankson JN. **Maintenance of viral suppression in HIV-1-infected HLA-B*57+ elite suppressors despite CTL escape mutations.** *J Exp Med* 2006; **203**:1357–1369.
41. Blankson JN, Bailey JR, Thayil S, Yang H-C, Lassen K, Lai J, *et al.* **Isolation and characterization of replication-competent human immunodeficiency virus type 1 from a subset of elite suppressors.** *J Virol* 2007; **81**:2508–2518.
42. O'Connell KA, Brennan TP, Bailey JR, Ray SC, Siliciano RF, Blankson JN. **Control of HIV-1 in elite suppressors despite ongoing replication and evolution in plasma virus.** *J Virol* 2010; **84**:7018–7028.
43. Hunt PW, Landay AL, Sinclair E, Martinson JA, Hatano H, Emu B, *et al.* **A low T regulatory cell response may contribute to both viral control and generalized immune activation in HIV controllers.** *PLoS One* 2011; **6**:e15924.
44. Wilson EMP, Krishnan S, Sheikh V, Rupert A, Mendoza D, Migueles SA, *et al.* **Evidence of innate immune activation in HIV-1-infected elite controllers.** *7th IAS Conference on HIV Pathogenesis, Treatment and Prevention, Kuala Lumpur, Malaysia; 30 June–3 July 2013 [Abstract MOLBPE07].*
45. Dutertre C-A, Amraoui S, DeRosa A, Jourdain J-P, Vimeux L, Goguet M, *et al.* **Pivotal role of M-DC8+ monocytes from viremic HIV-infected patients in TNFα overproduction in response to microbial products.** *Blood* 2012; **120**:2259–2268.
46. Ciccone EJ, Greenwald JH, Lee PI, Biancotto A, Read SW, Yao MA, *et al.* **CD4+ T cells, including Th17 and cycling subsets, are intact in the gut mucosa of HIV-1-infected long-term nonprogressors.** *J Virol* 2011; **85**:5880–5888.
47. Sauce D, Larsen M, Fastenackels S, Pauchard M, Ait-Mohand H, Schneider L, *et al.* **HIV disease progression despite suppression of viral replication is associated with exhaustion of lymphopoiesis.** *Blood* 2011; **117**:5142–5151.
48. Heller EA, Liu E, Tager AM, Yuan Q, Lin AY, Ahluwalia N, *et al.* **Chemokine CXCL10 promotes atherogenesis by modulating the local balance of effector and regulatory T cells.** *Circulation* 2006; **113**:2301–2312.
49. Bastard J-P, Soulié C, Fellahi S, Haïm-Boukobza S, Simon A, Katlama C, *et al.* **Circulating interleukin-6 levels correlate with residual HIV viraemia and markers of immune dysfunction in treatment-controlled HIV-infected patients.** *Antivir Ther* 2012; **17**:915–919.

1 **SUPPLEMENTAL FIGURES**

2 Supplemental Figure 1. Relationships (in HICs) between IP10 levels on one hand and
3 sCD14, sCD163 and MCP1 levels on the other, and between sCD14 and sCD163 levels
4 (\log_{10} transformation).

5

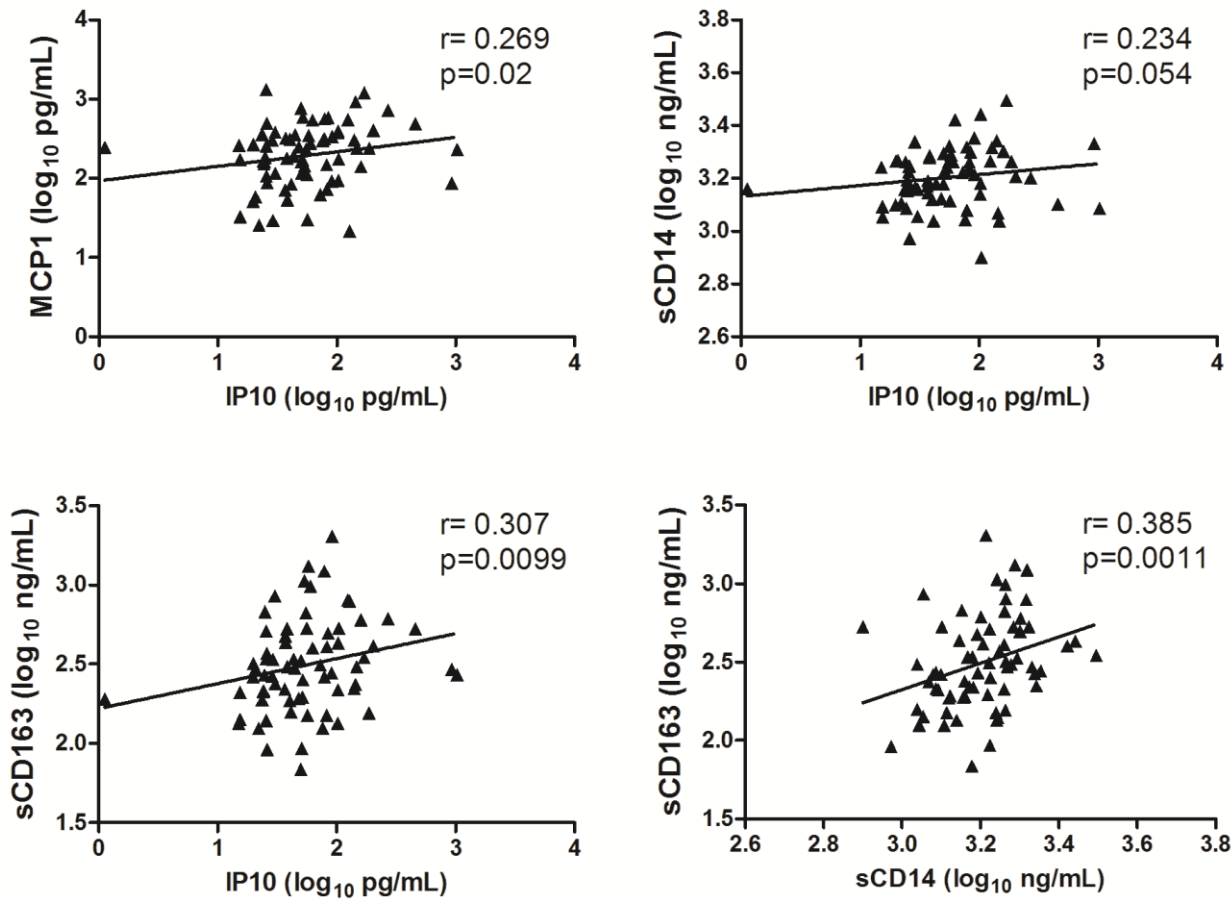
6 Supplemental Figure 2. Repeated measurements of IP10 at day 0, M12 and M24 in HICs.
7 There were no significant differences between the IP10 levels at the three time points
8 (in a Wilcoxon rank-sum test).

9

1 Supplemental Figure 1

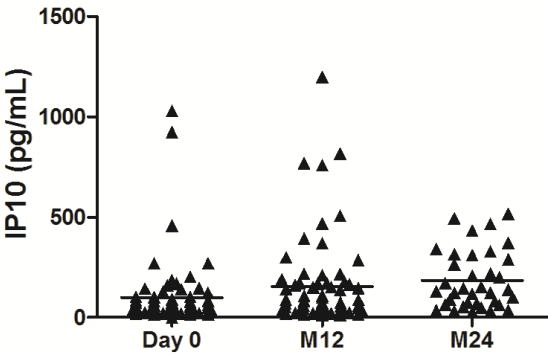
2

3



1 Supplemental Figure 2

2



TRAVAIL N°2 - Strong *ifitm1* expression in CD4 T cells in HIV controllers is correlated with immune activation

Etienne Canoui*, Nicolas Noel*, Camille Lécuroux, Faroudy Boufassa, Asier Sáez-Cirión, Christine Bourgeois, Olivier Lambotte and the ANRS CO21 CODEX study group

*: co-premiers auteurs

Version du manuscrit en cours de soumission

Au cours de ce travail, nous nous sommes intéressés à la mise en jeu de la voie des Interférons chez les patients HIV controllers. Cette voie nous semblait importante à la lumière des résultats suivants :

- l'activation des Interférons apparaît très tôt au cours de l'infection par le VIH et semble durer dans le temps chez les patients virémiques
- cette voie a un rôle de régulation important pour l'activation immunitaire de même que le contrôle antiviral
- chez les patients HIV controllers, des taux élevés d'IP10 suggèrent un rôle important des Interférons

Comme nous l'avons vu au paragraphe 2.2.3., la quantification des taux plasmatiques d'IFN reflète peu son activité biologique, et l'analyse de l'expression d'ISGs est préférable. Enfin, la régulation de la synthèse des ISGs est complexe et dépend sans doute du type de cellules analysées.

Ainsi, nous avons analysé en PCR quantitative l'expression de 4 ISGs choisis pour leurs liens avec l'activation des IFN de type I (*mxA*, *pkr*, *ifit1*) ou de type I et II (*ifitm1*), ainsi que pour leurs mécanismes distincts d'activité anti-virale. Cette expression était étudiée au sein de trois types cellulaires : les LT CD4, LT CD8 et monocytes circulants étaient triés *ex vivo* par cytométrie de flux (FACS Aria II, BD Biosciences™) selon les marquages CD3+CD4+, CD3+CD8+ et CD3-CD14+, respectivement.

Une analyse comparative de l'expression de ces ISGs a pu être effectuée chez 11 HICs, 8 patients virémiques, 8 patients contrôlés sous ARV et 8 témoins sains (définitions identiques au travail n°1). Ces données ont été analysées parallèlement aux données immuno-virologiques et aux paramètres d'activation lymphocytaire (pourcentage de LT CD4 et LT CD8 exprimant CD38 et HLADR) et monocyttaire (CD14 soluble).

Les principaux résultats ont été les suivants :

- (i) chez les HICs, l'expression d'*ifitm1* au sein des LT CD4 est supérieure à celle des témoins sains
- (ii) l'expression de *pkr* et d'*ifitm1* est corrélée positivement à la charge virale VIH et négativement aux taux de LT CD4 circulants pour la majeure partie des types cellulaires
- (iii) l'expression d'*ifitm1* dans chaque type cellulaire est associée aux marqueurs d'activation correspondant (ie, corrélation entre l'expression d'*ifitm1* au sein des LT CD4 et le pourcentage de LT CD4+CD38+HLADR+, entre *ifitm1* au sein des LT CD8 et le pourcentage de LT CD8+CD38+HLADR+, et entre *ifitm1* au sein des monocytes et les taux de CD14 soluble), en analysant tous les patients infectés de manière globale
- (iv) l'expression d'*ifitm1* est corrélée à l'activation mais pas à la charge virale, suggérant un rôle potentiellement important de cet ISG dans le contrôle antiviral en lien avec l'activation immunitaire et l'inflammation
- (v) l'expression des ISGs varie en fonction du type cellulaire analysé et du groupe de patients étudié

Strong *ifitm1* expression in CD4 T cells in HIV controllers is correlated with immune activation

Etienne CANOUI^{1, *}, Nicolas NOEL^{1, 2, 3, *}, Camille LÉCURoux¹, Faroudy BOUFASSA^{2, 4, 5}, Asier SÁEZ-CIRIÓ⁶, Christine BOURGEOIS¹, Olivier LAMBOTTE^{1, 2, 3 §} and the ANRS CO21 CODEX study group

¹: INSERM U1012, Régulation de la réponse immune, infection VIH1 et autoimmunité, Université Paris Sud, Le Kremlin-Bicêtre, France

²: Faculté de médecine Paris Sud XI, Le Kremlin-Bicêtre, France

³: Assistance Publique – Hôpitaux de Paris, Service de Médecine Interne et Immunologie Clinique, Groupe Hospitalier Universitaire Paris Sud, Hôpital Bicêtre, Le Kremlin-Bicêtre, France

⁴: INSERM U1018, Centre de recherche en Epidémiologie et Santé des Populations, Le Kremlin-Bicêtre, France

⁵: Assistance Publique – Hôpitaux de Paris, Département d'épidémiologie, Groupe Hospitalier Universitaire Paris Sud, Hôpital Bicêtre, Le Kremlin-Bicêtre, France

⁶: Institut Pasteur, Unité de Régulation des Infections Rétrovirales, Paris, France

*: co-first authors, equal contribution

§: Corresponding author

Pr Olivier Lambotte, Service de Médecine Interne et Immunologie Clinique

CHU Bicêtre ; 78, rue du Général Leclerc, 94275 Le Kremlin-Bicêtre CEDEX, FRANCE

Phone: +33 145 212 783, Fax: +33 145 212 733

olivier.lambotte@bct.aphp.fr

Count: Abstract 243 words, Main document 2043 words, 2 figures, 18 references, 2 supplemental figures, 2 supplemental tables

Conflict of interest: none were declared

Running head: *ifitm1* expression in HIV controllers

ABSTRACT

Background: The interferon-stimulated genes (ISGs) expression is poorly described in CD4, CD8 T cells and monocytes in HIV controllers (HICs).

Methods: qPCR quantification of four ISGs (*ifitm1*, *pkr*, *mxA* and *ifit1*) was performed in FACS-sorted CD4 and CD8 T lymphocytes and monocytes from 11 HIV controllers (HICs), 8 ART-treated patients (ARTs), 8 viremic progressors (VIRs) and 8 healthy donors (HDs) and put in relation with HLADR+CD38+ expression in T cells and soluble CD14 levels.

Results: *ifitm1* and *pkr* expression were higher in VIRs than in HDs, irrespective of the cell subtype ($p < 0.02$ for each) but *ifit1* only in CD4 T cells. *ifitm1* levels in CD4 T cells from HICs were elevated relative to HDs ($p=0.03$) but not different compared with ARTs and VIRs. In contrast, *pkr*, *ifit1* expression in all subsets, and *ifitm1* expression in monocytes were similar in HDs, in HICs and in ARTs. *mxA* was underexpressed in T cells from ARTs compared with HICs ($p<0.03$ for each) and VIRs ($p<0.003$ for each). The expression of *ifitm1* was significantly related to T cell activation when considering all HIV-1 infected patients. Interestingly, *ifitm1* expression in CD4 T cells was still correlated with HLADR+CD38+ activated CD4 T cells when analyzing HICs separately ($r=0.8$, $p= 0.003$).

Conclusion: The expression profile of ISGs is different according to the cell subtype, the HIV disease status and the ISG considered. In HICs, *ifitm1* seems to be an interesting ISG associated with immune CD4 T cell activation.

Key words: Type 1 Interferon (I-IFN), Interferon stimulated genes (ISGs), IFITM1, PKR, MxA, HIV-controller (HICs), HIV.

INTRODUCTION

Type-I-Interferon (IFN-I) is an important cytokine of the innate antiviral response, and the IFN-I-stimulated genes (ISGs) have been associated with HIV-1 pathophysiology, either by restricting HIV replication especially in primary infection [1], but it can also enhancing immune activation, or favour loss of CD4⁺ T cells especially in chronic phase [2]. Fernandez *et al* showed that elevated levels of ISGs in purified CD4 T cells of ART treated patients were associated with low estimated 10-year CD4 T cell counts [3]. The levels of ISGs expression depend on their function and the disease's state [2]. In viremic patients, ISGs' expression in CD4 and CD8 T cells is higher than in healthy donors (HDs) [4–6].

Few studies have focused on the expression of ISGs in HIV controller patients (HICs), and have yielded different results as compared with HDs, ART treated patients or viremic patients. In PBMCs from HICs, *ifit1* and *mxA* were found overexpressed compared with HDs and ART treated patients [7]. We have recently showed that IP10 levels were higher in HICs than HDs and associated with low CD4 T cell counts, suggesting links between HIV-1 pathogenesis and IFN-pathways in HICs [8]. Other studies reported that some ISGs known to restrict HIV, such as *schlaffen 11*, *apobec3c* and *apobec3d* were overexpressed in CD4 T cells or PBMCs from HICs [9,10]. To our knowledge, all these studies focused on ISGs expression either in total PBMCs or purified CD4 or CD8 T cells but ISG expression in monocytes was not individualized.

Here, we studied the expression of four ISGs in three cell subtypes (CD4 and CD8 T lymphocytes, and monocytes). We compared these expression profiles between HICs, HIV-1 infected ART-treated (ARTs) and viremic treatment-naïve patients

(VIRs), and healthy volunteers. The expression of these ISGs according to the levels of T and monocyte activation was studied.

PATIENTS AND METHODS

The HICs (n=11) were enrolled in the ANRS CO21 CODEX cohort [8,11], and defined as ART-naïve patients diagnosed at least 5 years previously and displaying VL below 400 copies/mL in the last five consecutive measurements. The ART-treated patients (n=8) had VL < 40 copies/mL for at least 2 years under therapy, and VIRs (n=8) were untreated patients with a VL > 10000 copies/mL followed at the department of internal medicine, Le Kremlin-Bicêtre hospital. HIV – negative healthy donors (HDs) (n=8) were recruited as controls. All patients gave their informed consent to participation in the study, in accordance with the Helsinki declaration.

PBMCs isolated by Ficoll density gradient on freshly collected EDTA blood samples were stained with the following conjugated monoclonal antibodies: PE-CD14, PerCP Cy5.5-CD8, APC-CD3, and APC-H7-CD4, before the FACS-based sorting procedure on BD ARIA (BD Biosciences™). Cells were sorted as follows: (i) CD4 T cells (CD3+CD4+); (ii) CD8 T cells (CD3+CD8+); (iii) monocytes (CD3-CD14+), and were immediately lysed in RNeasy Lysis Buffer (QIAGEN*) and cryopreserved at -80°C. RNA isolation and reverse transcription were performed according to the manufacturers' protocols (RNeasy mini kit, Qiagen™, and enhanced avian RT-PCR Kit, SIGMA™, respectively). qRT-PCR analysis was performed using a SyBR Green RT PCR method (LightCycler system, Roche™). All results were normalized for *gapdh* expression. The primers sense and antisense used for qRT-PCR for *ifitm1*, *ifit1*, *mxA*, *pkr* and *gapdh* are described in the supplemental Table 1.

Levels of soluble CD14 (sCD14) were determined by ELISA (R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, USA), and the surface expression of T-lymphocyte activation markers (HLA-DR and CD38) was analyzed by flow cytometry, as described previously [8].

For statistical analyses, continuous and categorical variables were compared using the non parametric Mann-Whitney U test and the χ^2 test, respectively. Spearman's coefficient was used for correlation analyses. The threshold for statistical significance was set to p less than 0.05. Data were stored and analysed using PRISM software (version 5, GraphPad software, La Jolla, California, USA).

RESULTS

There was no difference of age, and gender, between each group of patients. The HICs group had significantly higher median CD4⁺ T cell count than ARTs and VIRs. The VIRs group had significantly higher median HIV viral load than HICs and ARTs (supplemental Table 2).

ISGs expression is different according to the cell subtype and the group of patients.

The analysis of ISGs levels between groups and distinct cell subtypes (Figure 1) revealed different profiles depending on the gene considered. In particular, CD4 T cells and monocytes did not show similar expression patterns.

First of all, *ifitm1* and *pkr* expression were higher in viremic patients than in HDs, irrespective of the cell subtype ($p < 0.02$ for each comparison). Moreover, the ISG expression profiles of VIRs were similar when considering *ifitm1* expression in monocytes, *pkr* expression in CD4, CD8 T cells and in monocytes, and *ifit1*

expression in CD4, *i.e.* higher than in ARTs, HICs and HDs ($p < 0.05$), suggesting a strong role for the amount of virus in various ISG induction.

Interestingly, *ifitm1* levels in CD4 T cells from HICs ($p=0.03$) as well as from ARTs ($p=0.01$) were elevated relative to uninfected volunteers and similar with the level seen in VIRs. In contrast, *ifitm1* expression in monocytes, *pkr*, *ifit1* expression in all subsets were similar in HDs, in HICS and in ARTs. Regarding the other cell subtypes and the other ISGs, HICs had the same ISGs' expression profile than HDs.

mxA had a different expression profile. A non significant trend toward a higher expression in CD4 T cells from VIRs and HICs than in HDs ($p=0.1$ for both) was observed, but most of all, it was underexpressed in CD4 and CD8 T cells from ARTs compared with HICs ($p= 0.01$ and $p= 0.03$, respectively) and VIRs ($p= 0.003$ for both).

In summary, these four ISGs had different expression profile between HICs and each other groups and each cell subtypes implying the involvement of different factors in their regulation.

ISGs expression is correlated positively with HIV viral load and negatively with CD4 T cell count for most ISGs tested.

In view of this first observation, we hypothesized that the expression pattern of most ISGs was associated with the HIV viral load (VL). Indeed, pooling the data of all HIV infected patients, the HIV VL was correlated with the expression of *pkr* in CD4 T cells (Tc) ($r= 0.52$, $p= 0.005$), CD8 Tc ($r= 0.47$, $p= 0.01$), and monocytes ($r= 0.46$, $p=0.016$), as well as *mxA* in CD4 and CD8 Tc ($r=0.43$, $p= 0.01$ and $r=0.42$, $p=0.02$, respectively) (Supplemental Figure 1), but only with *ifit1* expression in CD4 Tc ($r=0.47$, $p=0.01$) and *ifitm1* in monocytes ($r= 0.59$, $p= 0.001$). Similar results were

observed when considering the HIV infected patients without antiretroviral therapy (ART) (i.e. VIRs + HICs, data not shown), except for *mxA*, suggesting a role for ART in *mxA* regulation.

Next, we looked at whether the levels of the four ISGs were associated with low CD4 T cell count at enrollment. Considering all HIV infected patients, the CD4 T cell count was negatively correlated with levels of *ifitm1* in each cell subtypes (CD4 Tc, $r = -0.41$, $p=0.03$; CD8 Tc, $r = -0.55$, $p=0.003$; monocytes, $r = -0.66$, $p= 0.0002$), *pknox1* in CD4 T cells ($r = -0.41$, $p= 0.037$) and monocytes ($r = -0.45$, $p= 0.02$) (with a strong trend for CD8 T cells ($r = -0.34$, $p=0.08$)), and *ifit1* only in CD4 T cells ($r = -0.43$, $p= 0.02$) (Supplemental Figure 2). The levels of *mxA* were not correlated with the CD4 T cell count.

***ifitm1* expression is correlated positively with the immune activation marker tested.**

Since some ISGs – such as *ifitm1* - were associated with CD4 T cell counts but barely with the HIV VL, we investigated the relationship between ISGs levels and immune activation. When all HIV-1 infected patients were considered, positive correlations were observed between *ifitm1* expression and the immune activation marker tested in the associated cellular counterpart (level of HLA-DR and CD38 for CD4 ($r = 0.4$, $p= 0.03$) and CD8 T cells ($r = 0.4$, $p= 0.04$), and sCD14 for the monocytes ($r=0.48$, $p= 0.02$)) (Figure 2a). Such relationships were not observed with the other ISGs, except for *ifit1* in CD4 T cells correlated with the proportion of activated CD4 T cells. Moreover, the correlation between *ifitm1* expression in CD4 T cells and the proportion of HLA-DR+CD38+ circulating CD4 T cells were maintained when only HICs were considered ($r=0.8$, $p= 0.003$) (Figure 2b).

DISCUSSION

Earlier studies showed that expression levels of ISGs in CD4 or CD8 T cells or PBMCs were associated with HIV-1 viral load, CD4 T cell count and markers of T-cell activation [4–6,12] but data in HIV controllers are limited. Our results support these associations and extend the literature data thanks to the use of sorted CD4 Tc, CD8 Tc, and monocytes isolated in three different groups of patients and HD.

Owing to the fact that monocytes play a pivotal role in HIV-1 pathogenesis, it seems important to study whether the ISG expression differed between CD4 T cells and monocytes of HIV-1 infected patients. To our knowledge, only one study had investigated the expression profile of ISGs by separating the CD3+CD4+ T cells and CD3-CD14+ monocytes in different groups of HIV infected patients including long-term non progressors [13]. Our data suggest that ISGs regulation is different according to the HIV-1 status, but also to each cell subtypes: individualization of the monocytes and CD4 T cells should be done in further ISGs studies.

Indeed, our results highlight the different regulation and production of ISGs during HIV-1 infection. *Pkr* in each cell subtypes, *ifitm1* in monocytes and *ifit1* in CD4 T cells were higher in VIRs than in the three other groups of patient suggesting a link with the viral load. This is enhanced by the correlation obtained between levels of these ISGs and the HIV viral load and coherent with the literature [4–6,12]. This correlation is in strong agreement with Hardy's results linking IFN-I activity and VL and support the use of these ISGs as surrogate markers for IFN-I activity [14]. *mxA* expression was decreased in each subtype cell in ARTs but not in HICs despite similarly low amounts of viral antigens which is puzzling, but correlated with viral load

in T cells. Results focusing on *mxA* expression are controversial in the literature (ref) and this point deserves further investigation.

In HICs' CD4 T cells, *ifitm1* was overexpressed compared with HDs unlike all others ISGs and all others subtypes cells. This higher expression of *ifitm1* in CD4 T cells from HICs was also found by two groups looking for mechanisms of HIV restriction in HICs [9,10]. Indeed, *ifitm1* has been recently described as part of a HIV-1 restriction factor family [15], suggesting that this ISG would be of particular interest for further studies aimed at elucidating the mechanisms of HIV control in HICs [16]. But the role of *ifitm1* could be more complex. Diamond and Farzan suggest that *ifitm1* might be induced by IL-6 or other acute-phases cytokines [17]. We showed *ifitm1* was globally linked with immune activation independently from the viral load, the correlation being still present only when HICs are studied. This ISG may thus be implicated in the excessive immune activation of HICs [7].

Our study is limited by the analysis of only four ISGs. We focused on *mxA* and *pkr* because they are both selectively induced by IFN-I [18] and are frequently used as surrogates for IFN-I activity [7,9,12,14]. *ifitm1* was interesting to study because of its antiviral mechanism recently described [15]. *ifit1* was previously used and allowed comparisons [3,7]. The number of patients studied in each group, although higher than in previous studies [13] and enough to get statistically significant results, is low and may not accurately represent the heterogeneity of these populations of patients.

Nevertheless, our results show that the expression profile of ISGs in HIV infected patients is different according to the cell subtype, the disease status and the ISG considered. ISGs could have different mechanism of regulation involving IFN-I, HIV viral load, immune activation and other unidentified factors related to cell

subtype. In particular, IFN signature in monocytes must be distinguished from the one in CD4 T cells. In HICs, *ifitm1* seem to be an ISG of interest associated with immune CD4 T cell activation. Its role in HIV pathogenesis deserves further investigation.

TABLE/FIGURE

FIGURE LEGEND

Fig. 1. Expression of Interferon (IFN) Stimulated Genes (ISGs) between groups (HIV – negative healthy donors (HDs), HIV controllers (HICs), aviremic ART-treated patients (ARTs) and viremic treatment naïve patients (VIRs)) and distinct cell subtypes (CD4 T cell, CD8 T cell and CD14 monocytes). (a) IFN-induced transmembrane protein 1 (IFITM1). (b) RNA-activated Protein Kinase (PKR). (c) IFN-induced protein with tetratricopeptide repeats (IFIT1). (d) Myxoma virus Resistance protein A (MxA). HDs, healthy donors; HICs, HIV controllers; ARTs, aviremic ART-treated patients; VIRs, viremic treatment naïve patients.

Fig. 2. Relationships with the expression of *ifitm1* and the immune activation marker (HLA-DR and CD38 for CD4 and CD8 T cells and level of sCD14 for the monocytes) in the associated cellular counterpart. (a) Considering all HIV-1 infected patients. (b) Considering HICs isolatedly. IFITM1, IFN-intduced transmembrane protein 1; HICs, HIV controllers; ARTs, aviremic ART-treated patients; VIRs, viremic treatment naïve patients.

FIGURE

Figure 1.

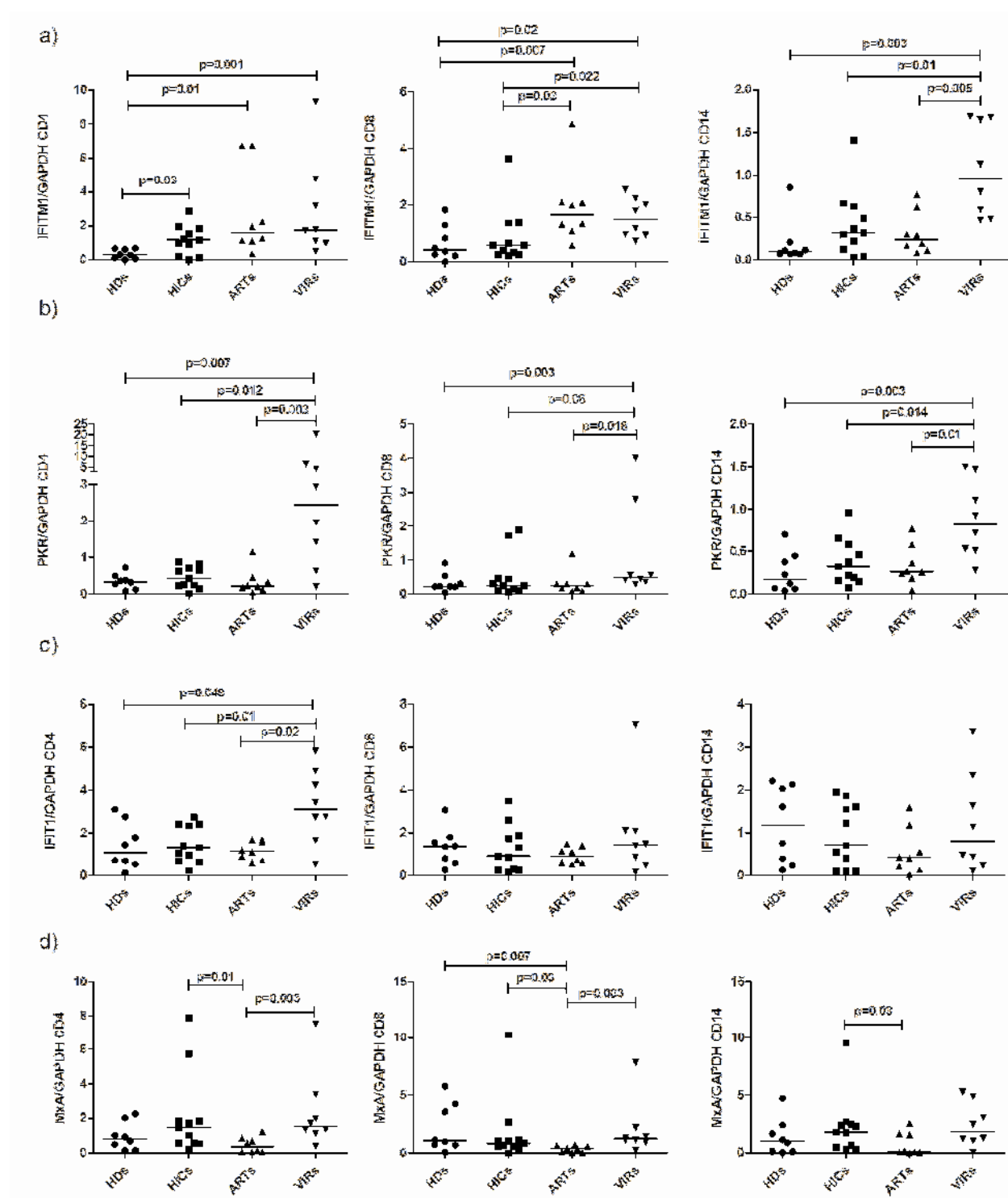
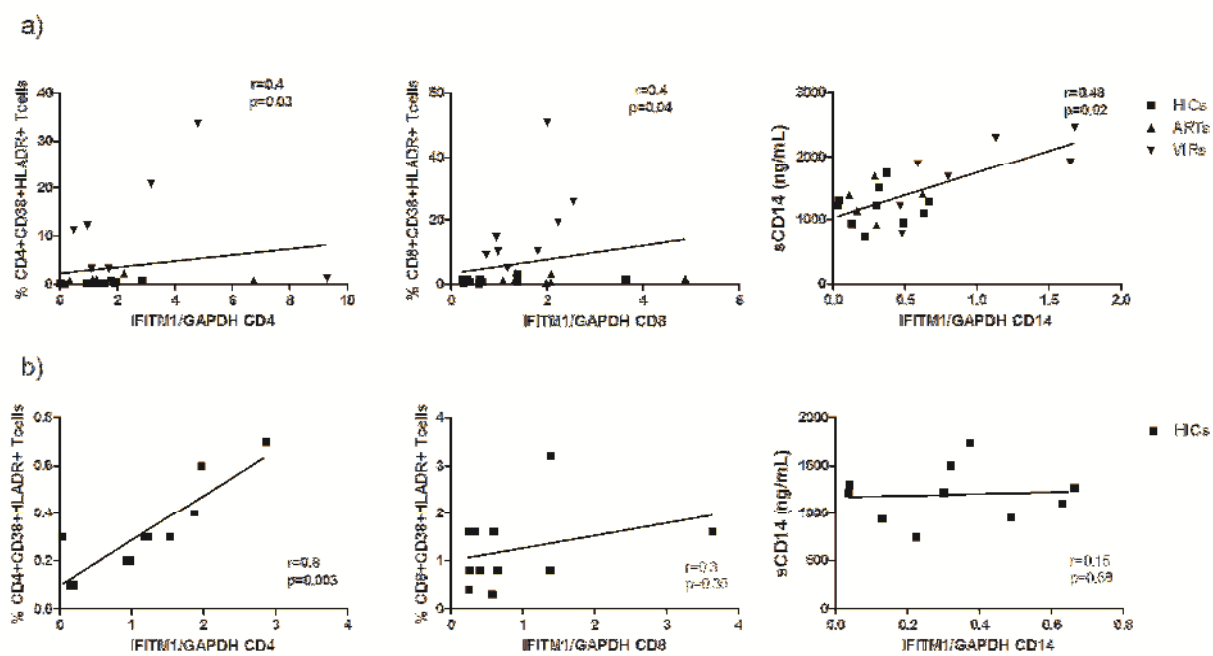


Figure 2.



SUPPLEMENTAL FIGURES/ TABLES

Table 1. Primers used for qRT-PCR

Table 2. Characteristics of study participants

Fig. 1. Relationships between the four ISGs and the viral load (VL) of all HIV-infected patients. (a) IFN-induced transmembrane protein 1 (IFITM1). (b) RNA-activated Protein Kinase (PKR). (c) IFN-induced protein with tetratricopeptide repeats (IFIT1). (d) Myxoma virus Resistance protein A (MxA). HIV controllers; ARTs, aviremic ART-treated patients; VIRs, viremic treatment naïve patients; VL, viral load.

Fig. 2. Relationships between the four ISGs and the CD4 T cell count of all HIV-infected patients. (a) IFN-induced transmembrane protein 1 (IFITM1). (b) RNA-activated Protein Kinase (PKR). (c) IFN-induced protein with tetratricopeptide repeats (IFIT1). (d) Myxoma virus Resistance protein A (MxA). HICs, HIV controllers; ARTs, aviremic ART-treated patients; VIRs, viremic treatment naïve patients.

Supplemental Figure/ Table

Supplemental Table 1

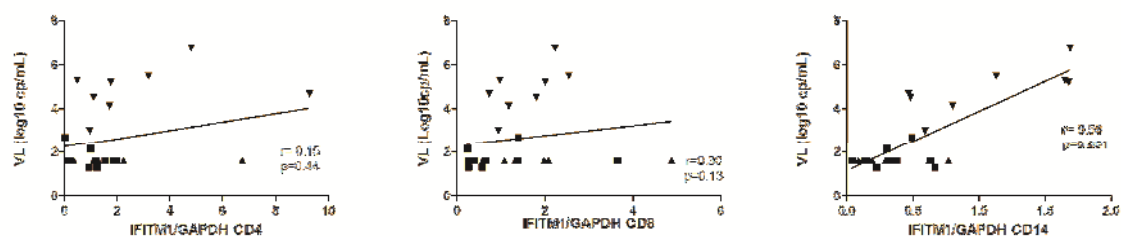
| Supplemental Table 1 : Primers used for qRT-PCR | | |
|--|-------------------------------|--------------------------------|
| genes | sense | antisense |
| <i>gapdh</i> (Invitrogen™) | 5'-GAGGGATCTCGCTCCTGGGAAGA-3' | 5'-GGTGAAGGCGGAGTCAACGGA-3' |
| <i>mxA</i> (Sigma-genesys™) | 5'-TGCCAGGAAGGTCTATTAG-3' | 5'-TACCAGGACTACGAGATTG-3' |
| <i>ifit1</i> (Eurogentec™) | 5'-AGTCAGCAGCCAGTCTCAG-3' | 5'-CTCCTTGGGTTCGTCTACAAATTG-3' |
| <i>ifitm1</i> (Eurogentec™) | 5'-CCTGTCACTGGTATTCGGCTCT-3' | 5'-CAGGCTATGGGCGGCTAC-3' |
| <i>pkrr</i> (Eurogentec™) | 5'-GGATACATGAGCCCAGAACA-3' | 5'-GTTTCAAAAGCAGTGTCACA-3' |
| <i>gapdh</i> , Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; <i>mxA</i> , Myxoma virus Resitance protein A; <i>ifitm1</i> , IFN-induced transmembrane protein 1; <i>pkrr</i> , RNA-activated Protein Kinase; <i>ifit1</i> , IFN-induced protein with tetratricopeptide repeats | | |

Supplemental Table 2

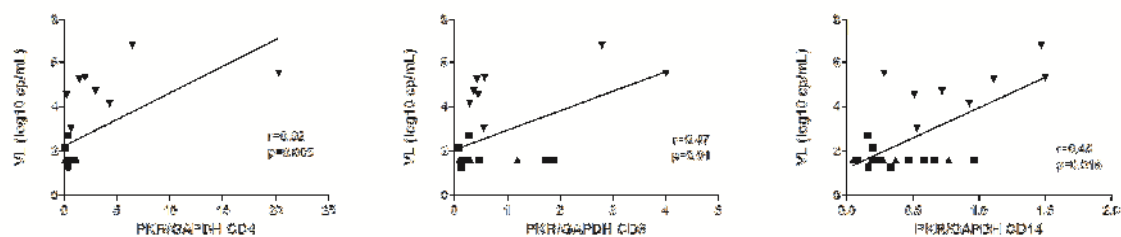
| Supplemental Table 2. Characteristics of study participants | | | | | |
|---|-----------------|--------------------|------------------|----------------|-------|
| Characteristics | HDs (n=8) | HICs (n=11) | ARTs (n=8) | VIRs (n=8) | p |
| Age (years) | 46 [43.75-48.5] | 46.5 [42.25-50.75] | 47 [43-53] | 37 [32-54] | 0.6 |
| Male, <i>n</i> (%) | 3 (37) | 4 (36) | 4 (50) | 3 (37) | 0.7 |
| CD4+ T-cell count at enrollment (cells/ μ L) | - | 875 [768-1001] | 467 [430-550] | 100 [46-184] | <0.01 |
| Lowest CD4+ T-cell count since HIV diagnosis (nadir) (cells/ μ L) | - | 523 [464.5-637] | 285 [272-330] | 100 [46-184] | <0.01 |
| Plasma HIV RNA VL at enrollment (log10copies/ml) | - | 1.6 [<1.6-1.6] | <1.6 [<1.6-<1.6] | 4.9 [4.4-5.35] | <0.01 |
| HCV coinfection, <i>n</i> (%) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 1 (14) | 0.3 |
| HBV coninfection, <i>n</i> (%) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 2 (28) | 0.06 |
| Active opportunistic infection at enrollment, <i>n</i> (%) | - | 0 | 0 | 5 (62) | <0.01 |
| Results are shown as median (IQR) or <i>n</i> (%). HDs, healthy donors; HICs, HIV controllers; ARTs, aviremic ART-treated patients; VIRs, viremic treatment naïve patients ; VL, viral load | | | | | |

Supplemental Figure 1

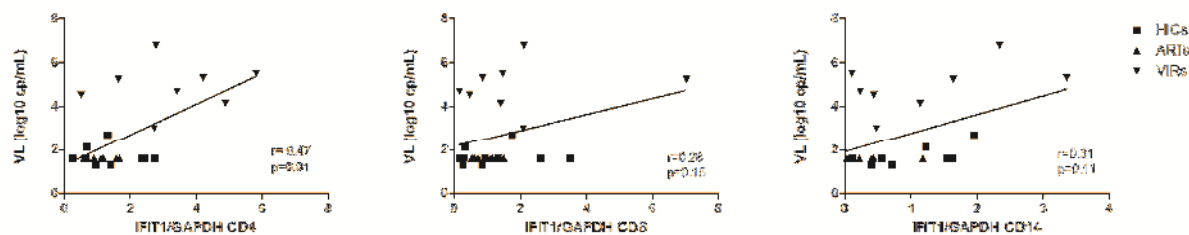
a)



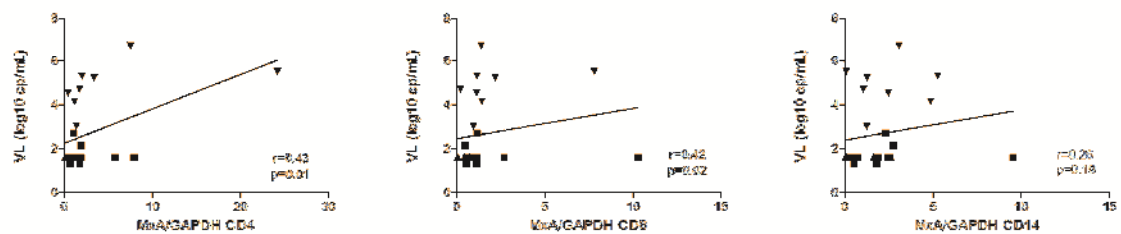
b)



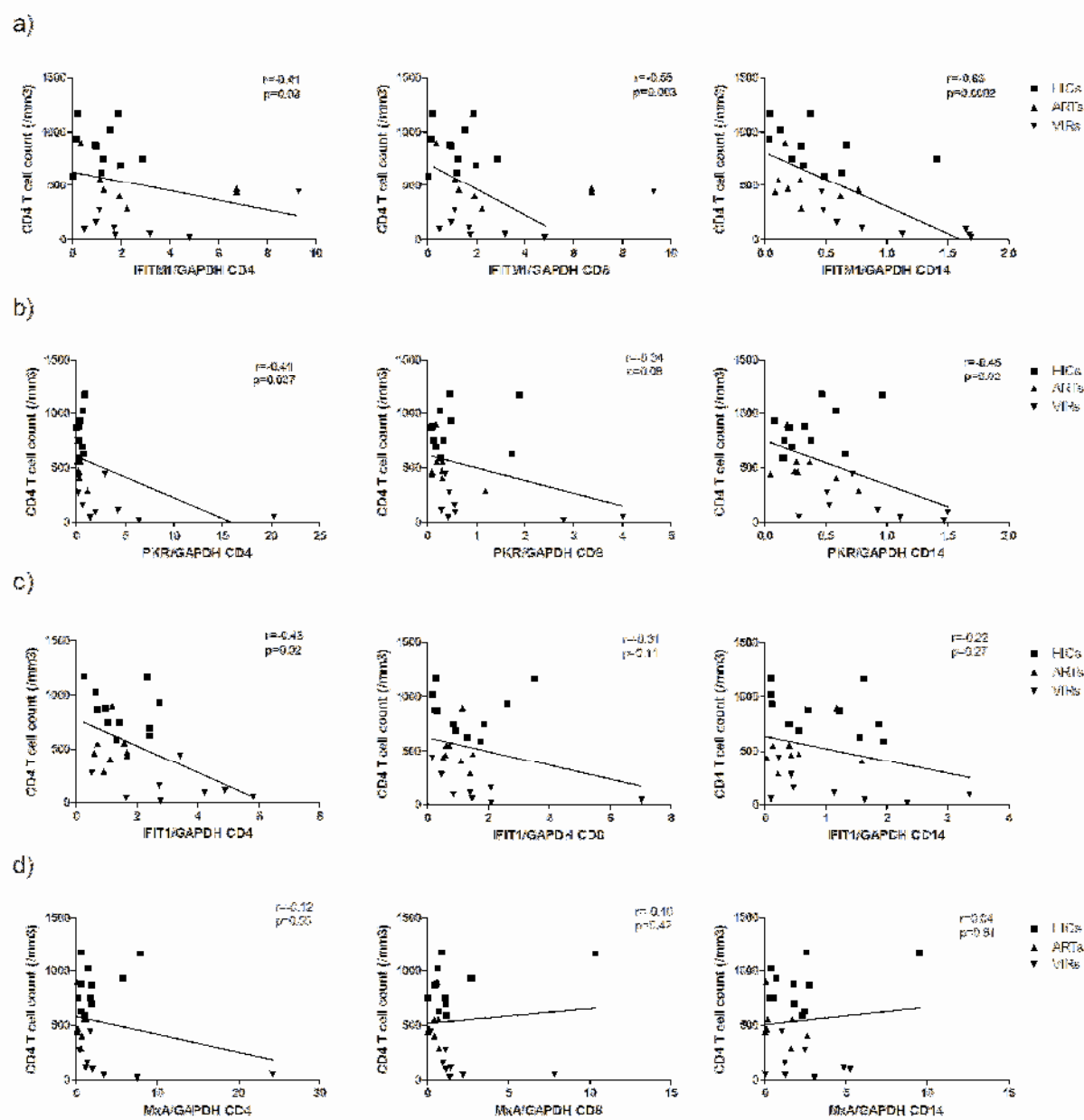
c)



d)



Supplemental Figure 2



REFERENCES:

1. Fenton-May AE, Dibben O, Emmerich T, Ding H, Pfafferoth K, Aasa-Chapman MM, et al. Relative resistance of HIV-1 founder viruses to control by interferon-alpha. *Retrovirology*. 2013; 10:146.
2. Herbeuval J-P, Shearer GM. HIV-1 immunopathogenesis: how good interferon turns bad. *Clin Immunol* 2007; 123(2):121-8.
3. Fernandez S, Tanaskovic S, Helbig K, Rajasuriar R, Kramski M, Murray JM, et al. CD4+ T-cell deficiency in HIV patients responding to antiretroviral therapy is associated with increased expression of interferon-stimulated genes in CD4+ T cells. *J Infect Dis*. 15 déc 2011; 204(12):1927-35.
4. Hyrcza MD, Kovacs C, Loutfy M, Halpenny R, Heisler L, Yang S, et al. Distinct Transcriptional Profiles in Ex Vivo CD4+ and CD8+ T Cells Are Established Early in Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection and Are Characterized by a Chronic Interferon Response as Well as Extensive Transcriptional Changes in CD8+ T Cells. *J Virol*. 2007; 81(7):3477-86.
5. Sedaghat AR, German J, Teslovich TM, Cofrancesco J Jr, Jie CC, Talbot CC Jr, et al. Chronic CD4+ T-cell activation and depletion in human immunodeficiency virus type 1 infection: type I interferon-mediated disruption of T-cell dynamics. *J Virol*. 2008; 82(4):1870-83.
6. Rotger M, Dang KK, Fellay J, Heinzen EL, Feng S, Descombes P, et al. Genome-wide mRNA expression correlates of viral control in CD4+ T-cells from HIV-1-infected individuals. *PLoS Pathog*. 2010; 6(2):e1000781.
7. Krishnan S, Wilson EMP, Sheikh V, Rupert A, Mendoza D, Yang J, et al. Evidence for innate immune system activation in HIV type 1-infected elite controllers. *J Infect Dis*. 2014;209(6):931-9.
8. Noel N, Boufassa F, Lécureux C, Saez-Cirion A, Bourgeois C, Dunnyach-Remy C, et al. Elevated IP10 levels are associated with immune activation and low CD4⁺ T-cell counts in HIV controller patients. *AIDS* 2014;28(4):467-76.
9. Abdel-Mohsen M, Raposo RAS, Deng X, Li M, Liegler T, Sinclair E, et al. Expression profile of host restriction factors in HIV-1 elite controllers. *Retrovirology*. 2013; 10:106.
10. De Masson A, Kirilovsky A, Zoorob R, Avettand-Fenoel V, Morin V, Oudin A, et al. Blimp-1 overexpression is associated with low HIV-1 reservoir and transcription levels in central memory CD4+ T cells from elite controllers. *AIDS* 2014;

11. Boufassa F, Saez-Cirion A, Lechenadec J, Zucman D, Avettand-Fenoel V, Venet A, et al. CD4 dynamics over a 15 year-period among HIV controllers enrolled in the ANRS French observatory. *PloS One*. 2011; 6(4):e18726.
12. Jacquelin B, Mayau V, Targat B, Liovat A-S, Kunkel D, Petitjean G, et al. Nonpathogenic SIV infection of African green monkeys induces a strong but rapidly controlled type I IFN response. *J Clin Invest*. 2009;119(12):3544-55.
13. Wu JQ, Sassé TR, Wolkenstein G, Conceicao V, Saksena MM, Soedjono M, et al. Transcriptome analysis of primary monocytes shows global down-regulation of genetic networks in HIV viremic patients versus long-term non-progressors. *Virology*. 2013;435(2):308-19.
14. Hardy GAD, Sieg S, Rodriguez B, Anthony D, Asaad R, Jiang W, et al. Interferon- α is the primary plasma type-I IFN in HIV-1 infection and correlates with immune activation and disease markers. *PloS One*. 2013; 8(2):e56527.
15. Lu J, Pan Q, Rong L, He W, Liu S-L, Liang C. The IFITM proteins inhibit HIV-1 infection. *J Virol*. 2011;85(5):2126-37.
16. Sáez-Cirión A, Hamimi C, Bergamaschi A, David A, Versmisse P, Mélard A, et al. Restriction of HIV-1 replication in macrophages and CD4+ T cells from HIV controllers. *Blood*. 2011;118(4):955-64.
17. Diamond MS, Farzan M. The broad-spectrum antiviral functions of IFIT and IFITM proteins. *Nat Rev Immunol*. 2013; 13(1):46-57.
18. Liu S-Y, Sanchez DJ, Aliyari R, Lu S, Cheng G. Systematic identification of type I and type II interferon-induced antiviral factors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 13 mars 2012;109(11):4239-44.

TRAVAIL N°3 - Immunological and virological progression in HIV controllers: role of viral “blips” and immune activation -the ANRS C021 CODEX study

Nicolas Noel*, Nathalie Lerolle*, Camille Lécureux, Cécile Goujard, Alain Venet, Asier Sáez-Cirión, Veronique Avettand-Fenoel, Laurence Meyer, Faroudy Boufassa, Olivier Lambotte and the ANRS C021 CODEX study group

*: co-premiers auteurs

Version du manuscrit en cours de soumission

Enfin, nous avons voulu étudier quels étaient les facteurs sous-tendant la baisse des LT CD4 et la perte de contrôle virologique chez les patients HIV controllers inclus dans la cohorte ANRS C021 CODEX.

Comparativement aux autres études menées sur les patients HIV controllers, la cohorte CODEX nous permet en effet d’avoir un suivi prospectif de ces patients au cours du temps, et d’analyser les données cliniques ainsi que les paramètres d’activation lymphocytaire et d’inflammation en lien avec des évènements identifiés.

Nous avons ainsi défini les patients présentant des échappements immunologiques ou virologiques comme suit :

-une suspicion d’échappement immunologique était déclarée lorsqu’un patient HIC présentait une baisse du taux de LT CD4 < 350/ μ L, ou de plus de 200 T CD4/ μ L si son taux antérieur était < 600/ μ L.

-une suspicion d’échappement virologique était déclarée lorsqu’un patient HIC présentait une charge virale VIH dans son centre > 2000 copies/mL.

Dans les deux situations, un prélèvement de contrôle était demandé. L’échappement – immunologique ou virologique – était confirmé sur ce deuxième prélèvement en l’absence de retour à l’état basal.

Pour chaque patient en situation d'échappement, les évènements cliniques – quels qu'ils aient été – survenus dans les mois précédents étaient analysés. Ces évènements étaient étudiés en lien avec les paramètres d'activation lymphocytaire T CD4 et T CD8 (pourcentage de LT CD38+HLADR+ circulants) et les biomarqueurs d'inflammation analysés dans le Travail n°1.

Fait important, les échappements ont été identifiés au cours du suivi dans la cohorte, soit entre 1 et 3 ans après l'inclusion des patients. Ceci nous a permis d'étudier, chez les patients en échappement, les paramètres immuno-virologiques à l'inclusion préalables à ces évènements.

Les principaux résultats ont été les suivants :

- (i) parmi les 217 patients HICs consécutivement inclus dans CODEX, 37 ont présenté une suspicion d'échappement. Cet échappement a été confirmé chez 15 d'entre eux (10 échappements immunologiques, 5 échappements virologiques)
- (ii) 2/5 patients présentant un échappement virologique ont déclaré des rapports sexuels non protégés dans les mois précédents, suggérant le rôle possible de superinfections par une autre souche de VIH
- (iii) des taux de CV VIH ultrasensible à l'inclusion plus élevés étaient associés au risque d'échappement immunologique comme virologique. De même, un nadir CD4 et un taux de LT CD4 plus bas à l'inclusion étaient associés au risque d'échappement immunologique
- (iv) des taux d'IP10 et d'activation immunitaire T CD4 et T CD8 plus élevés à l'inclusion étaient associés au risque d'échappement immunologique

Immunological and virological progression in HIV controllers: role of viral “blips” and immune activation: the ANRS C021 CODEX study

Nicolas Noel^{1, 2, 3, *}, Nathalie Lerolle^{2, 3, *}, Camille Lécuroux¹, Cécile Goujard^{2, 3, 4}, Alain Venet¹, Asier Saez-Cirion⁵, Veronique Avettand-Fenoel^{6,7}, Laurence Meyer^{3,4}, Faroudy Boufassa⁴, Olivier Lambotte^{1, 2, 3} and the ANRS C021 CODEX study group

1: INSERM U1012, Régulation de la réponse immune, infection VIH1 et autoimmunité, Université Paris Sud, Le Kremlin Bicêtre, France

2: APHP, Service de Médecine Interne, Hôpitaux Universitaires Paris Sud, Le Kremlin-Bicêtre, France

3: Faculté de Médecine Paris Sud, Le Kremlin Bicêtre, France

4: INSERM U1018, Centre de recherche en Epidémiologie et Santé des Populations, Université Paris Sud, Le Kremlin Bicêtre, France

5 : Institut Pasteur, Unité des Infections Retrovirales, Paris, France

6 : Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Faculté de Médecine, EA 7327, Paris France

7. :APHP, Service de Virologie, Hôpital Necker – Enfants Malades, Paris , France

Corresponding author: Professor Olivier Lambotte, MD, PhD

Service de Médecine Interne

CHU Bicêtre

78 rue du Général Leclerc

F-94275 Le Kremlin Bicêtre Cedex. France Tel.: +33 145 212 783. Fax: +33 145 212 733.

Mail: olivier.lambotte@bct.aphp.fr

1 **ABSTRACT**

2 **Objective:** To investigate the rate and determinants of immunological and/or virological
3 progressions (IP/VP) in of HIV controllers (HICs) included in the ANRS CO21/CODEX cohort.

4 **Design:** Cohort study

5 **Methods:** IP was suspected if the CD4 T cell count fell $< 350/\text{mm}^3$ or if CD4 T cell count
6 declined of more than $200/\text{mm}^3$ between two consecutive CD4 T cell count determinations.
7 VP was suspected if the HIV VL rose above 2000 copies/ml. Events were confirmed if similar
8 results were found in a second consecutive measurement. Clinical characteristics were
9 analysed at inclusion in the cohort and prior to the event. Immune activation and
10 inflammatory parameters (% of HLADR+CD38+ T cells, IP10 levels), ultrasensitive HIV VL and
11 total HIV DNA were compared using non parametric tests with the non-progressor HICs.

12 **Results:** Of 217 patients enrolled in the cohort and followed between 2009 and 2013, 37
13 patients experienced at least one suspicion of progression. This was confirmed in 15 patients
14 (6.9% of the cohort; IP, $n=10$; VP, $n=5$). No differences in terms of HLA B57 status or HCV
15 coinfection were observed. Unprotected sexual intercourses were reported in the recent
16 history of some HICs, but not more frequently in progressors. Relative to non-progressors,
17 immunological progressors (IPs) HICs had lower CD4 T cell nadir (median (IQR): 292 (236-
18 373) vs. 516 (412-681)/ mm^3 , $p<0.001$) and VPs had higher ultrasensitive HIV RNA levels at
19 inclusion (i.e., 1-2 years before progression). Interestingly, CD8 T cell activation and IP10
20 levels of IPs at inclusion were significantly higher than in non-progressors ($p<0.001$), almost
21 as elevated as observed in viremic non HICs patients.

22 **Conclusion:** CD4 T cell nadir, level of residual HIV replication and levels of basal immune
23 activation seem major determinants to progression in HICs, and should be considered in
24 order to adjust their follow-up and optimize the timing of cART initiation.

1

2 **Key words:** HIV controllers, HIV replication, activation, lymphopenia, antiretroviral

3 treatment

4

1 **Introduction**

2 Most untreated HIV individuals experience continuous viral replication and progressive CD4+
3 T cell depletion. The rare HIV controllers (HICs), HIV-1-infected patients who display long-
4 term spontaneous control of viremia (1–3) are usually infected with replication-competent
5 viruses (4). Most of them exhibit potent antiviral immune responses which are mediated by
6 polyfunctional cytotoxic CD8+ and CD4+ T cells of high avidity (5–9). The patients genetic
7 background also influences the control of the virus, since the HLA-B57 and B27 alleles are
8 over-represented in HICs (2,10).

9 However, some HICs exhibit a decline in their CD4+ T cell count during the period of HIV
10 control or eventually lose the ability to control HIV(11,12). Low levels of HIV replication can
11 be detected using ultrasensitive techniques (11,13). This low-grade viral replication could be
12 correlated with the CD4+ T cell decline. Chronic immune activation is also present in HICs
13 and could be deleterious, leading also to CD4+ T cell decline (14,15), and cardiovascular
14 events (16,17).

15
16 Little is known about the long-term prognosis of HICs but 20 years after HIV diagnosis. In a
17 large seroconverters cohort collaboration, 25% of HICs had lost the “controller status” in a
18 after 20 years of follow-up since seroconversion (18). A few reports describe disease
19 progression in some HICs (14,19–21). Different situations can occur: immunological
20 progression (i.e., CD4+ T cells decline) despite low or undetectable viral loads, loss of control
21 of HIV replication, or both. These situations can be sometimes transient, such as a “blip” of
22 viral replication (11,18,21). Progression can be favoured by an undercurrent disease as
23 hepatitis C (22,23), HIV superinfection (24,25), or introduction of particular treatments such
24 as immunosuppressive drugs in organ graft (26). However, limited data are still available on

1 risk factors for progression in HICs. Understanding the mechanisms leading to disease
2 progression in HICs could help to identify the major determinants of HIV control and also
3 optimize the care of these rare patients.

4

5 To address these issues, we investigated the rate and determinants of immunological,
6 virological and combined progressions in the French ANRS HIV Controllers cohort (ANRS
7 C021 CODEX). We particularly focused on: i) the underlying events preceding the
8 progression, ii) the levels of ultrasensitive HIV viral load (VL), HIV DNA, T cell activation and
9 plasma inflammatory biomarkers at enrolment. The evolution of these parameters after the
10 immunological/virological progression in these patients is also reported.

11

12

Patients and methods

Definition of the ANRS CO21 CoDEx cohort

In this study, we analysed the 217 first HIV controllers (HICs) enrolled in the French multicenter ANRS HIV Controller CO18/CO21 CODEX cohort since 2009. To be enrolled, patients had to be ART-naïve, to have been diagnosed at least 5 years before enrolment, and to have displayed viral loads (VLs) below 400 copies/mL the last five consecutive measurements. The study was approved by the regional investigational review board (Comité de Protection des Personnes Ile-de-France VII (Paris, France); approval reference: 05-22) and performed in compliance with the tenets of the Declaration of Helsinki.

Definition of the immunological/viral progression

After enrolment in the CoDEx cohort, suspected immunological progression was defined as: one CD4⁺ T cell count under 350/mm³ or a CD4⁺ decline of more than 200 from a last CD4⁺ count of $\leq 600/\text{mm}^3$. Suspected viral progression was defined as one HIV RNA measurement above 2000 copies/mL. If both criteria were met, patients were considered to experience a suspected combined progression.

Such cases were referred to as confirmed immunological and/or virological progression if the criteria described above were present in two consecutive blood samplings. If ART was started before the second confirmation blood sampling, the progression was classified as suspected.

For analysis of T cell activation and inflammatory biomarker levels, the control groups consisted of (i) viremic (VL>10,000 copies/mL), treatment-naïve patients (viremic patients), (ii) ART-treated patients for at least one year with no detectable VL (<50 copies/mL) (ART-treated patients), as already described in (15,27).

1

2 **Data collection**

3 Clinical characteristics (age, gender, HCV coinfection, comorbidities, HIV history (year of HIV
4 diagnosis, CD4+ nadir, number and intensity of transient detectable plasma viral loads
5 (blips), baseline CD4+ and HIV RNA VL) were collected. The characteristics of the parameters
6 of interest (CD4+ and CD8+ T cell counts, and HIV viral load before progression, at the time
7 of the suspected progression, at the next visit, and at the last measurement) were
8 documented. ART initiation (date of initiation, ART regimen) was recorded. A standardized
9 data collection form was provided to investigate potential clinical events occurring in the 3
10 months prior to the suspected progression (e.g. unprotected sex intercourse, intravenous
11 drug use, undercurrent infectious events, vaccine, medication change...). Since the start of
12 the cohort in 2009, blood samples were collected each year, at the time of the suspected
13 progression, one month later to confirm or not the progression, and at ART initiation, for
14 viral and immunological analysis.

15 **Immunological and virological assays**

16 CD4+ T cell counts were routinely determined by flow cytometry using standard procedures.
17 Ultra-sensitive HIV-RNA VL was measured using ultrasensitive real time PCR (Generic HIV
18 Charge Virale, Biocentric, Bandol, France). HIV-1 RNA was extracted from a 10 mL
19 centrifuged plasma sample (90 minutes at 15 000 rpm) with the QiAamp® Viral RNA Mini kit
20 (Qiagen, Courtaboeuf, France) and extracts were tested in five PCRs. The quantification
21 threshold of this ultrasensitive PCR was 1 copie/mL. Total cell-associated HIV-1 DNA is
22 quantified as described elsewhere (28).

23 The levels of plasma cyto/chemokines were measured in a FlowCytomix™ bead-based
24 multiplex immunoassay (IP10, TNF α , IL6, MCP1, IL10: eBioscience Inc., San Diego, CA, USA),

1 or specific ELISAs (Human IL6 Platinum ELISA, eBioscience, CRP Gen.3 kit, Roche diagnostics,
2 Indianapolis, IN, USA; sCD14 and sCD163 Duokine ELISAs, R&D Systems, Minneapolis, MN,
3 USA), as previously described (15). Surface expression of T lymphocyte activation markers
4 (HLA-DR and CD38) was analyzed by flow cytometry of the HICs' whole blood samples, as
5 described elsewhere (29). HIV-specific CD8+ T cell response was measured by ELISPOT IFN- γ
6 assay using pools of optimal peptides according to the subjects' HLA and to the HIV protein
7 as previously described (27).

8 The *ex vivo* capacity of HIV-specific CD8+ T cells to suppress HIV-1 infection of autologous
9 CD4+ T cells was assessed as previously published (29,30).

10 **Statistical analyses**

11 Data are expressed as the median [1st-3rd quartile] for continuous variables, and *n* (%) for
12 categorical variables. Continuous and categorical data were compared between groups using
13 Mann-Whitney, Chi-squared or Fisher's tests, when applicable. The threshold for statistical
14 significance was set to $p < 0.05$ for all analyses. Data were entered and analyzed using PRISM
15 software (version 5, GraphPad Software, La Jolla, CA).

Results

Characteristics of the patients

Out of 217 HIV controllers included in the CoDEx cohort, we collected all declaration of suspected progression until the 06/31/2013. As represented in the Figure 1, 37 out of the 217 patients experienced at least one suspicion of progression. Twenty-six patients experienced at least one or two drops in their CD4 T cell count (this situation occurred twice in two patients, leading to 28 suspicion of immunological progression). Six patients had at least one HIV RNA VL above 2000 copies/mL, and 5 patients had both criteria at the same time on one blood sample.

However, the progression was confirmed on a consecutive blood sample in only 15 patients out of these 37 ones (6.9% of the total 217 patients) (i.e., 10 patients with immunological progression and 5 with viral progression). Of the 22 remaining patients, the progression could not be confirmed, either because the criteria were not fulfilled on the second consecutive sample (n=15), or because ART was initiated before the confirmation sample (n=7).

At the time of confirmed progression, the median [IQR] HIV RNA VL was 132 [39-858] copies/mL and 2210 [2119-3085] copies /mL in immunological and virological progressors, respectively. In the same measurement, the median [IQR] CD4 T cell count was 320 [301-336] and 2210 [2119-3085]/mm³, respectively. Examples of immunological, combined and viral progressions are depicted in Figure 2.

Analysis of clinical factors prior to the immunological/virological progressions in HICs

In order to analyse the factors that could lead to disease progression during the follow-up of HICs, we looked for potential remarkable clinical events during the 3 months before the

1 progression. Potential underlying events were identified in 7 patients. Two out of the 5
2 patients with virological progression reported unprotected sexual intercourses in the
3 previous 3 months. However, this potential risk factor was also reported in 63 out of the 197
4 non-progressor HICs from whom the information was available (including patients in stable
5 relationships). This frequency was not statistically different.

6 Three patients developed immunological progression in the months after infectious events
7 (respectively a diarrhoea and *Chlamydia trachomatis* infection, two episodes of prostatitis, a
8 gastro-enteritis and a whitlow, and two bronchitis for the last one). One patient underwent
9 epidural injection with corticosteroids within the month before immunological progression.
10 Lastly, one patient was diagnosed with a B-cell lymphoma four months after combined
11 progression. Of note, except for this patient, neither AIDS nor non-AIDS serious events as
12 cardiovascular events or cancer were reported despite disease progression.

13
14 Next, we compared clinical and immunological factors at enrolment in the cohort between
15 HICs who further experienced progression with so-called “non-progressor HICs”. Data are
16 summarized in Table 1. There was no difference in terms of age, sex, HLA B57 status or HCV
17 coinfection between the groups. As compared with non-progressor HICs, patients at risk of
18 immunological progression had a lower CD4+ T cell nadir (median [IQR]: 292 [236-373] vs.
19 516 [412-681], respectively, $p < 0.001$) as well as a lower CD4 T cell count at study entry
20 (median [IQR]: 427 [266-498] vs. 761 [579-950], respectively, $p < 0.001$).

21
22 In addition, the ultra-sensitive HIV RNA VL at enrolment, as well as the frequency of blips
23 prior to the enrolment in the CoDEx cohort, were higher in HICs at risk of immunological
24 progression than in non-progressors HIC (Table 1). The ultra-sensitive HIV RNA VL at

1 enrolment and the total HIV DNA were higher in HICs with virological progression compared
2 with non-progressor HICs (HIV DNA: 80.5 [37.25-318]/10⁶ PBMCs) vs. 11 [10-45]/10⁶ PBMCs,
3 $p < 0.05$). Interestingly, there was only one elite controller (defined as HIC never
4 experiencing any VL above the detection threshold) among the HIC who progressed
5 immunologically – and none in the virological progression group - versus 67 % in those who
6 did not.

7
8 **Analysis of immune activation parameters prior to the immunological/virological**
9 **progressions in HICs**

10 Lastly, we assessed whether the parameters of immune activation/inflammation at
11 enrolment in the cohort could help help to predict progression.

12 As shown in Figure 3, the frequency of circulating activated CD8+ and CD4+ T cells, as
13 defined by the expression of both HLA-DR and CD38 surface antigens, were both higher in
14 patients at risk of immunological progression relative to non-progressor HICs. Only the levels
15 of activated CD8+ T cells were significantly higher in patients at risk of virological
16 progression. Interestingly, the percentage of activated T cells were as elevated in both
17 progressor HICs as in viremic patients, whereas non-progressor HICs exhibited similarly low
18 activation as ART-suppressed patients (Figure 3).

19 Similarly, IP10 levels at enrolment were statistically higher in immunological/combined
20 progressors and in viremic patients, whereas they were low in both non-progressor HICs and
21 in ART-treated patients. No other of the tested biomarkers (MCP1, TNF α , IL6, sCD14,
22 sCD163, CRP, IL10) was found useful to distinguish progressor from non-progressor HICs.

23 The level of the ability of CD8+ T cell to control HIV replication *in vitro* was not different
24 between the different groups (data not shown).

1

2 **Evolution of HICs after immunological or virological progression**

3 The median [IQR] follow-up since enrolment in the cohort was 37 [35-41] months. Combined
4 antiretroviral treatment (cART) was initiated in 20 out of the 37 HICs with a suspected
5 progression (54%), including 15 with immunological, 3 with combined and 2 with virological
6 suspected progression. Seven patients underwent ARV therapy before the progression could
7 be confirmed (ie, before the second blood sample)..

8 In treated patients, the median [range] CD4+ T cell count was 300/mm³ [168-924] after 6
9 months and 389/mm³ [212-754] after 12 months. The HIV-RNA VL was undetectable for all
10 tested patients after 6 and 12 months. Interestingly, one patient who had stopped cART
11 after 7 months because of digestive side effects had maintained an undetectable viral load (<
12 20 copies/mL) even one year after stopping treatment.

13

1 Discussion

2 Here, we characterized 15 HICs who experienced HIV disease progression with
3 immunological progression (CD4+ T cell count decrease) and/or uncontrolled HIV replication
4 out of 217 patients from one of the largest well-defined cohort of HIV controller patients to
5 date. The main conclusions that can be drawn are that (i) a history of profound
6 immunological damages – as represented by the CD4+ T cell nadir – or a long term low level
7 but detectable viral replication (between 50 and 400 RNA copies/ml) and higher HIV DNA
8 load in blood are major determinants for further progression, (ii) HICs who will experience
9 disease progression have higher levels of immunological activation and inflammation before
10 progression. Altogether, these findings point to a subgroup of HIV controller patients who
11 should benefit from closer follow-up and/or earlier therapeutic interventions.

12

13 The frequency of progression seen in this cohort is of 6.9% when only confirmed progressors
14 are considered. Limited data are published on this topic (14,18,20,21). Okulicz *et al.*
15 described 3 out of 25 well defined elite controllers (12%) who underwent antiviral therapy
16 during their follow-up (20). Hunt *et al.* found that 3 (10%) of 30 HIV controllers had CD4+ T
17 cell count below 350/ μ L at study entry (14). These frequencies (10-15% of patients with
18 CD4+ T cell decrease and/or viral escape) are in agreement with the frequency of viral loss of
19 control reported in the largest study on the long term follow-up of HICs in the CASCADE
20 collaboration (18). Indeed, Madec *et al.* reported 22 losses of virological control (15.7%) in
21 140 HICs with a follow-up of 20 years (18). Indeed, the estimated probability of maintaining
22 control was 74% at 15 years after seroconversion in the CASCADE study (18).

23

1 The analysis of putative clinically relevant events retrieved that 2 out of the 5 HICs
2 experiencing loss of virological control had unprotected sexual intercourse. A similar
3 circumstance probably accounts for the patient experiencing *Chlamydia* infection, a sexually
4 transmitted infection, with subsequent progression. These events are suggestive of potential
5 superinfections in these 3 patients. Nevertheless, the lack of sufficient plasma samples did
6 not allow us to confirm this hypothesis by phylogenetic analyses (4). However,
7 superinfections have already been documented in some HICs (25,31), with either
8 maintenance of HIV control (4) or virological progression (25). This points out that elite
9 control can be disrupted over time, particularly when the immune system become
10 overwhelmed by a high viral input. In patients with high risk of superinfection, cART seems
11 to be mandatory.

12

13 With respect to immunological progression, two cases deserve attention, as they had
14 recurrent bacterial infections. On one hand, such infections could contribute to an excessive
15 inflammation leading to alteration of the CD4+ T cell homeostasia with an increase of viral
16 replication (at least in the patient with *Chlamydia* infection and combined progression). One
17 the other hand, they could also result from HIV-induce immune dysregulation with increased
18 susceptibility to infection. Lastly, one patient had a diagnosis of B-cell lymphoma around the
19 period of progression. In a similar manner, haematological malignancies could enhance
20 immune activation and contribute to CD4 T cell decline and loss of immune antiviral control.
21 However, these results do not allow us to draw conclusions on the causality of these factors.
22 Further prospective studies are needed to collect exhaustive data at the time of virological
23 and/or immunological progression.

24

1 Aside from punctual documented events, one should consider each patient's history of HIV
2 control. We showed that the CD4+ T cell nadir, as well as the CD4+ T cell count at enrolment,
3 but alsoa history of blips, and a higher ultrasensitive HIV RNA viral load at inclusion are
4 possible determinants for further immunological progression. We previously showed that
5 the presence of blips in HICs is associated with a higher probability of CD4+ decline (11). In a
6 similar manner, Hunt *et al.*(14) found that, even if the CD4+ T cell count was globally stable,
7 the time-to-CD4+ decline ($< 350/\mu\text{L}$) was statistically shorter in viremic controllers than
8 inECs, underlying the link between a low-level viral replication and the CD4+ kinetics.
9 Alteration of CD4+ T cell homeostasia and the level of viral replication both seem to
10 contribute to CD4+ T cell attrition and immunological progression.

11 Interestingly, the level of blood HIV DNA, which reflects the HIV reservoir, and a higher
12 ultrasensitive HIV RNA viral load at inclusion seem to be associated with viral as well as
13 immunological progression. Our data are in accordance with those from the CASCADE
14 consortium: blips not followed by a return of non-detectability were associated with a higher
15 risk of virological progression, introducing the notion of "pre-escape" blips (18).

16

17 For the first time, we could also analyse the level of immune activation and systemic
18 inflammation in HICs before the progression. In the literature, a correlation exists between
19 CD4+ and CD8+ activation and the concomitant low-level viraemia, as well as a negative
20 correlation with the CD4+ count (14,32). In our previous study on 70 HICs from the same
21 cohort, we also observed that the levels of IP10 were stable over 2 years, and that IP10
22 levels at inclusion in the cohort were negatively correlated with CD4+ T cell counts (15).
23 Here, we extend this observation in that we show that patients with higher CD4+ or CD8+ T
24 cell activation and IP10 levels at inclusion are at risk of experiencing further progression.

Moreover, T cell activation and IP10 levels are as elevated in progressor HICs as in treatment naïve viremic patients, whereas the same factors are similarly low in non-progressor HICs and in ART-suppressed patients. We suggest that these parameters could be taken into account in order to optimize HICs' follow-up and care.

Combination ART is now recommended for all HIV-infected patients but the indication to treat all HIV controller patients remains controversial (33). Interestingly, in our work as in previous ones (14,20), the majority of HICs starting cART presented with solely immunological progression. The analysis of the effect of cART on the CD4+ kinetics was beyond the scope of our present study. However, some studies have evaluated the timing strategy of antiretroviral therapy in HICs (12,34,35). While the effect on HIV viral load is always achieved, the efficacy on CD4+ T cell reconstitution varies. HICs seem to have a slow CD4+ T cell recovery under cART (12), suggesting that an earlier initiation of therapy could be beneficial to HICs with a negative CD4+ T cell slope associated with immune activation.

In conclusion, HIV controller patients form a heterogeneous group of HIV-infected patients with various definitions as recently pointed (36,37). This work shows that, in the French controllers cohort, about 7% of patients have experienced virological and/or immunological progression in a 5-year period. The history of HIV infection (CD4+ T cell nadir and kinetics, low-level HIV RNA viral load and blips, HIV DNA load) as well as the levels of baseline immune activation and inflammation, are major determinants to progression. All these parameters should be taken into account to stratify patients at risk in order to adjust their follow-up and to optimize the timing of cART initiation.

1 **ACKNOWLEDGMENTS**

2 The authors thank the patients for their participation in this study. Special thanks are also
3 due to Azeb Tadesse and Samia Hendou who monitored the data, as well as all physicians
4 and nurses involved in the cohort.

5

6 **The steering committee of the ANRS CO21 study group:**

7 Henri Agut, Brigitte Autran, Faroudy Boufassa, Dominique Costagliola, Olivier Lambotte,
8 Laurence Meyer, Gianfranco Pancino, Christine Rouzioux, Ioannis Theodorou, Alain Venet

9

10 **FUNDING STATEMENT**

11 Nicolas Noel received a PhD fellowship from the Fondation pour la Recherche Médicale
12 (FRM). This work was funded by the Agence Nationale pour la Recherche contre le SIDA
13 (ANRS), INSERM and Paris-Sud University.

14

15 **Author contributions**

16 Designed the research: NN, NL, FB, AV, OL

17 Collected the clinical data: NN, NL

18 Performed and analysed the experiments: NN, CL, VAF

19 Performed statistical analyses: NN, FB

20 Wrote the paper: NN, NL, OL

21 Reviewed and approved the final version of the manuscript: all authors

22

23

REFERENCES

1. Lambotte O, Boufassa F, Madec Y, Nguyen A, Goujard C, Meyer L, et al. HIV controllers: a homogeneous group of HIV-1-infected patients with spontaneous control of viral replication. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 1 oct 2005;41(7):1053-6.
2. Deeks SG, Walker BD. Human immunodeficiency virus controllers: mechanisms of durable virus control in the absence of antiretroviral therapy. *Immunity*. sept 2007;27(3):406-16.
3. Emu B, Sinclair E, Favre D, Moretto WJ, Hsue P, Hoh R, et al. Phenotypic, functional, and kinetic parameters associated with apparent T-cell control of human immunodeficiency virus replication in individuals with and without antiretroviral treatment. *J Virol*. nov 2005;79(22):14169-78.
4. Lamine A, Caumont-Sarcos A, Chaix M-L, Saez-Cirion A, Rouzioux C, Delfraissy J-F, et al. Replication-competent HIV strains infect HIV controllers despite undetectable viremia (ANRS EP36 study). *AIDS Lond Engl*. 11 mai 2007;21(8):1043-5.
5. Sáez-Cirión A, Lacabartz C, Lambotte O, Versmissen P, Urrutia A, Boufassa F, et al. HIV controllers exhibit potent CD8 T cell capacity to suppress HIV infection ex vivo and peculiar cytotoxic T lymphocyte activation phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 17 avr 2007;104(16):6776-81.
6. Migueles SA, Osborne CM, Royce C, Compton AA, Joshi RP, Weeks KA, et al. Lytic granule loading of CD8+ T cells is required for HIV-infected cell elimination associated with immune control. *Immunity*. 19 déc 2008;29(6):1009-21.
7. Ndhlovu ZM, Chibnik LB, Proudfoot J, Vine S, McMullen A, Cesa K, et al. High-dimensional immune monitoring models of HIV-1-specific CD8 T cell responses accurately identify subjects achieving spontaneous viral control. *Blood*. 11 déc 2012;
8. Betts MR, Nason MC, West SM, De Rosa SC, Migueles SA, Abraham J, et al. HIV nonprogressors preferentially maintain highly functional HIV-specific CD8+ T cells. *Blood*. 15 juin 2006;107(12):4781-9.
9. Vingert B, Perez-Patrigueon S, Jeannin P, Lambotte O, Boufassa F, Lemaître F, et al. HIV controller CD4+ T cells respond to minimal amounts of Gag antigen due to high TCR avidity. *PLoS Pathog*. févr 2010;6(2):e1000780.
10. Sáez-Cirión A, Pancino G, Sinet M, Venet A, Lambotte O. HIV controllers: how do they tame the virus? *Trends Immunol*. déc 2007;28(12):532-40.
11. Boufassa F, Saez-Cirion A, Lechenadec J, Zucman D, Avettand-Fenoel V, Venet A, et al. CD4 dynamics over a 15 year-period among HIV controllers enrolled in the ANRS French observatory. *PloS One*. 2011;6(4):e18726.
12. Boufassa F, Lechenadec J, Meyer L, Costagliola D, Hunt PW, Pereyra F, et al. Blunted Response to Combination Antiretroviral Therapy in HIV Elite Controllers: An International HIV Controller Collaboration. *PloS One*. 17 janv 2014;9(1):e85516.
13. Hatano H, Delwart EL, Norris PJ, Lee T-H, Dunn-Williams J, Hunt PW, et al. Evidence for persistent low-level viremia in individuals who control human immunodeficiency virus in the absence of antiretroviral therapy. *J Virol*. janv 2009;83(1):329-35.
14. Hunt PW, Brenchley J, Sinclair E, McCune JM, Roland M, Page-Shafer K, et al. Relationship between T cell activation and CD4+ T cell count in HIV-seropositive individuals with undetectable plasma HIV RNA levels in the absence of therapy. *J Infect Dis*. 1 janv 2008;197(1):126-33.
15. Noel N, Boufassa F, Lécuroux C, Saez-Cirion A, Bourgeois C, Dunyach-Remy C, et al. Elevated IP10 levels are associated with immune activation and low CD4+ T-cell counts in HIV controller patients. *AIDS Lond Engl*. 20 févr 2014;28(4):467-76.
16. Pereyra F, Lo J, Triant VA, Wei J, Buzon MJ, Fitch KV, et al. Increased coronary

- 1 atherosclerosis and immune activation in HIV-1 elite controllers. *AIDS Lond Engl.* 28 nov
2 2012;26(18):2409–12.
- 3 17. Hsue PY, Hunt PW, Schnell A, Kalapus SC, Hoh R, Ganz P, et al. Role of viral
4 replication, antiretroviral therapy, and immunodeficiency in HIV-associated atherosclerosis.
5 *AIDS Lond Engl.* 1 juin 2009;23(9):1059–67.
- 6 18. Madec Y, Boufassa F, Porter K, Prins M, Sabin C, d' Arminio Monforte A, et al.
7 Natural history of HIV-control since seroconversion. *AIDS Lond Engl.* 24 sept
8 2013;27(15):2451–60.
- 9 19. Sedaghat AR, Rastegar DA, O'Connell KA, Dinoso JB, Wilke CO, Blankson JN. T
10 cell dynamics and the response to HAART in a cohort of HIV-1-infected elite suppressors.
11 *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 1 déc 2009;49(11):1763–6.
- 12 20. Okulicz JF, Marconi VC, Landrum ML, Wegner S, Weintrob A, Ganesan A, et al.
13 Clinical outcomes of elite controllers, viremic controllers, and long-term nonprogressors in
14 the US Department of Defense HIV natural history study. *J Infect Dis.* 1 déc
15 2009;200(11):1714–23.
- 16 21. Groves KC, Bibby DF, Clark DA, Isaksen A, Deayton JR, Anderson J, et al. Disease
17 Progression in HIV-1-Infected Viremic Controllers. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1999. 1
18 déc 2012;61(4):407–16.
- 19 22. Sajadi MM, Pulijala R, Redfield RR, Talwani R. Chronic immune activation and
20 decreased CD4 cell counts associated with hepatitis C infection in HIV-1 natural viral
21 suppressors. *AIDS Lond Engl.* 24 sept 2012;26(15):1879–84.
- 22 23. Ruiz-Mateos E, Machmach K, Romero-Sanchez MC, Ferrando-Martinez S, Viciano P,
23 Del Val M, et al. Hepatitis C virus replication in Caucasian HIV controllers. *J Viral Hepat.*
24 juill 2011;18(7):e350–7.
- 25 24. Rachinger A, Navis M, van Assen S, Groeneveld PHP, Schuitemaker H. Recovery of
26 viremic control after superinfection with pathogenic HIV type 1 in a long-term elite controller
27 of HIV type 1 infection. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 1 déc
28 2008;47(11):e86–9.
- 29 25. Clerc O, Colombo S, Yerly S, Telenti A, Cavassini M. HIV-1 elite controllers: beware
30 of super-infections. *J Clin Virol Off Publ Pan Am Soc Clin Virol.* avr 2010;47(4):376–8.
- 31 26. Lambotte O, Lecuroux C, Saez-Cirion A, Barbet C, Shin SY, Boufassa F, et al.
32 Kidney transplantation in an elite HIV controller: limited impact of immunosuppressive
33 therapy on viro-immunological status. *J Infect.* juin 2012;64(6):630–3.
- 34 27. Lécroux C, Sáez-Cirión A, Girault I, Versmisse P, Boufassa F, Avettand-Fenoël V, et
35 al. Both HLA-B*57 and plasma HIV RNA levels contribute to the HIV-specific CD8+ T cell
36 response in HIV controllers. *J Virol.* janv 2014;88(1):176–87.
- 37 28. Avettand-Fenoël V, Chaix M-L, Blanche S, Burgard M, Floch C, Toure K, et al. LTR
38 real-time PCR for HIV-1 DNA quantitation in blood cells for early diagnosis in infants born
39 to seropositive mothers treated in HAART area (ANRS CO 01). *J Med Virol.* févr
40 2009;81(2):217–23.
- 41 29. Sáez-Cirión A, Sinet M, Shin SY, Urrutia A, Versmisse P, Lacabartz C, et al.
42 Heterogeneity in HIV suppression by CD8 T cells from HIV controllers: association with
43 Gag-specific CD8 T cell responses. *J Immunol Baltim Md* 1950. 15 juin
44 2009;182(12):7828–37.
- 45 30. Sáez-Cirión A, Shin SY, Versmisse P, Barré-Sinoussi F, Pancino G. Ex vivo T cell-
46 based HIV suppression assay to evaluate HIV-specific CD8+ T-cell responses. *Nat Protoc.*
47 juin 2010;5(6):1033–41.
- 48 31. Rachinger A, Navis M, van Assen S, Groeneveld PHP, Schuitemaker H. Recovery of
49 viremic control after superinfection with pathogenic HIV type 1 in a long-term elite controller
50 of HIV type 1 infection. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 1 déc

1 2008;47(11):e86–9.

2 32. Pereyra F, Palmer S, Miura T, Block BL, Wiegand A, Rothchild AC, et al. Persistent
3 low-level viremia in HIV-1 elite controllers and relationship to immunologic parameters. *J*
4 *Infect Dis*. 15 sept 2009;200(6):984–90.

5 33. Morlat P. Prise en charge médicale des personnes vivant avec le VIH.
6 Recommandations du groupe d'experts. Rapport 2013.

7 34. Hatano H, Yukl SA, Ferre AL, Graf EH, Somsouk M, Sinclair E, et al. Prospective
8 antiretroviral treatment of asymptomatic, HIV-1 infected controllers. *PLoS Pathog*.
9 2013;9(10):e1003691.

10 35. Okulicz JF, Grandits GA, Weintrob AC, Landrum ML, Ganesan A, Crum-Cianflone
11 NF, et al. CD4 T cell count reconstitution in HIV controllers after highly active antiretroviral
12 therapy. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 15 avr 2010;50(8):1187–91.

13 36. Gurdasani D, Iles L, Dillon DG, Young EH, Olson AD, Naranbhai V, et al. A
14 systematic review of definitions of extreme phenotypes of HIV control and progression. *AIDS*
15 *Lond Engl*. 14 janv 2014;28(2):149–62.

16 37. Olson AD, Meyer L, Prins M, Thiebaut R, Gurdasani D, Guiguet M, et al. An
17 evaluation of HIV elite controller definitions within a large seroconverter cohort
18 collaboration. *PloS One*. 2014;9(1):e86719.

19

1 TABLES

2

Table 1. Characteristics of the study population at enrolment into the cohort.

| | HICs with immune progression (n=10) | HICs with virological progression (n=5) | Non-progressor HICs (n=202) |
|--|--|--|--------------------------------|
| Male gender, n (%) | 3 (30) | 3 (60) | 98 (48,5) |
| Age (years) | 48 (43-56) | 34 (32-34)*** | 45 (39-50) |
| Duration of known HIV infection (years) | 18 (13-23) | 5 (5-8)*** | 13 (8-20) |
| HLA B57+ (%) | 3/9 (33) | 1/5 (20) | 65/165 (39,4) |
| HCV+ status, n (%) | 3 (30) | 1 (20) | 44 (22,8) |
| CD4 T cell nadir (/mm ³) | 292 (236-373)*** | 453 (413-463) | 516 (412-681) |
| CD4 T cell count (/mm ³) | 427(266-498)*** | 643 (527-1447) | 761 (579-950) |
| Ultra-sensitive HIV RNA (copies/mL) | 117 [12-274]** | 296 [49-1377]** | 12 [4-45.25] |
| Total HIV DNA (/10 ⁶ PBMCs) | 19.5 [11-49.25] | 80.5 [37.25-318]* | 11 [10-45] |
| % of detectable VLs during history | 35 (17-52)* | 32 (17-47) | 21 (18-25) |
| Elite controllers (%) | 1 | 0 | 67 |

Results are shown as median (25-75 IQR) or %, respectively. All comparisons performed relative to the non-progressor HICs group. *: $p<0.05$, **: $p<0.01$, ***: $p<0.001$.

3

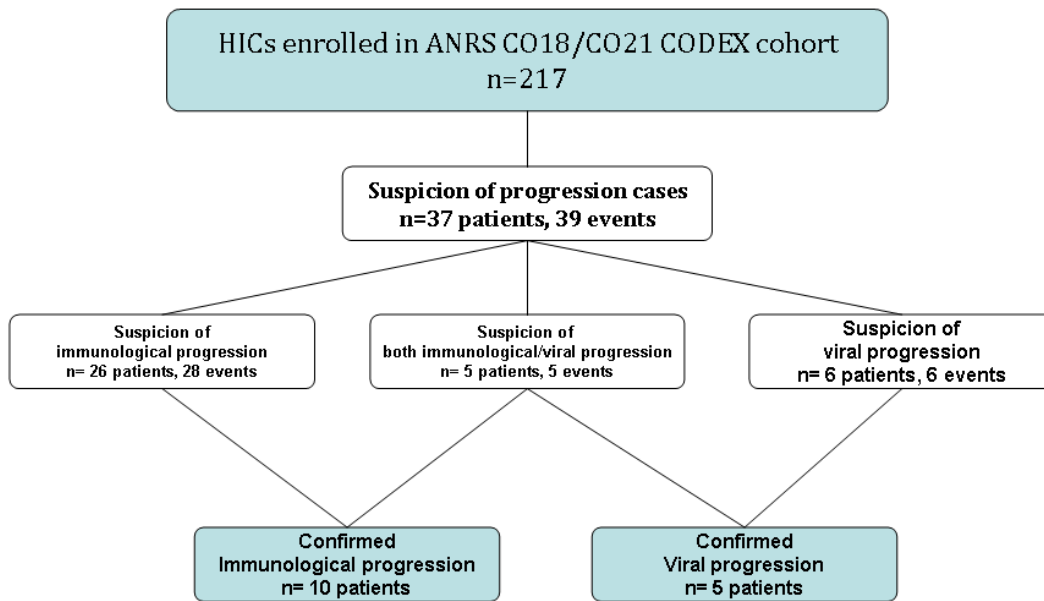
FIGURE LEGENDS

Figure 1. Flow chart of the study population. ANRS: Agence Nationale de Recherche sur le SIDA et les hépatites virales, ART: antiretroviral therapy, CODEX: COhorte Des EXtrêmes, HICs: HIV controllers

Figure 2. Examples of immunological (A), combined (B) and virological (C) progression situations.

Figure 3. Comparison of immune activation parameters in HICs at risk of immunological or virological progression vs. non-progressor HICs, compared with ART-treated patients, chronic viremic patients and healthy donors.. A. Frequency of circulating activated HLADR+CR38+ CD4 T cells. B. Frequency of circulating activated HLADR+CR38+ CD8 T cells. C. Circulating IP10 levels (pg/mL, log10 scale).

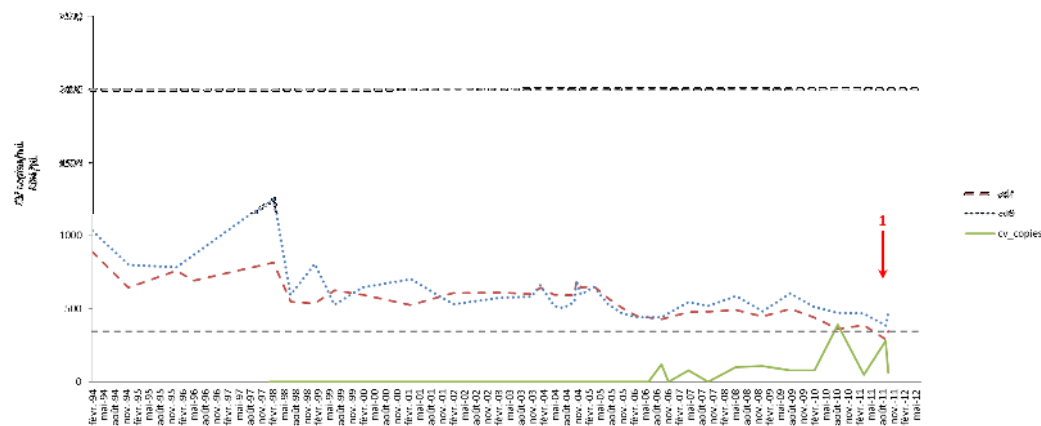
1 **Figure 1 Flow-chart of the study**



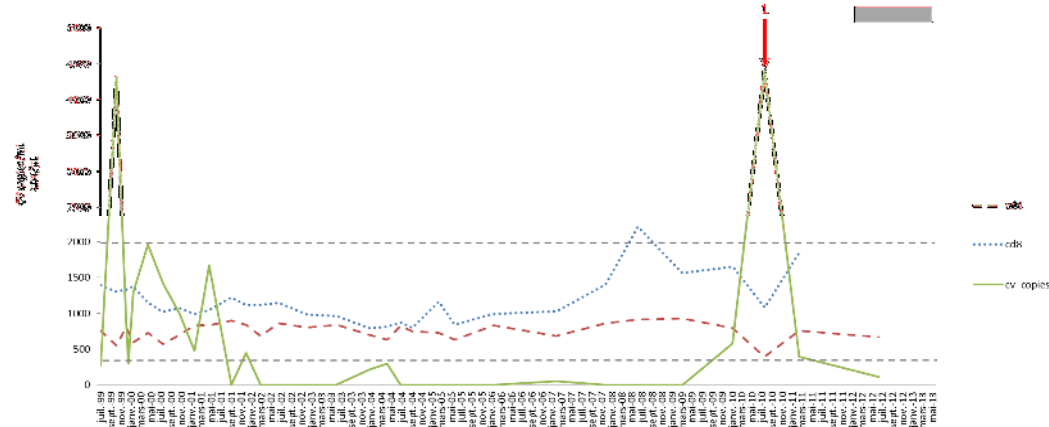
2

1 **Figure 2**

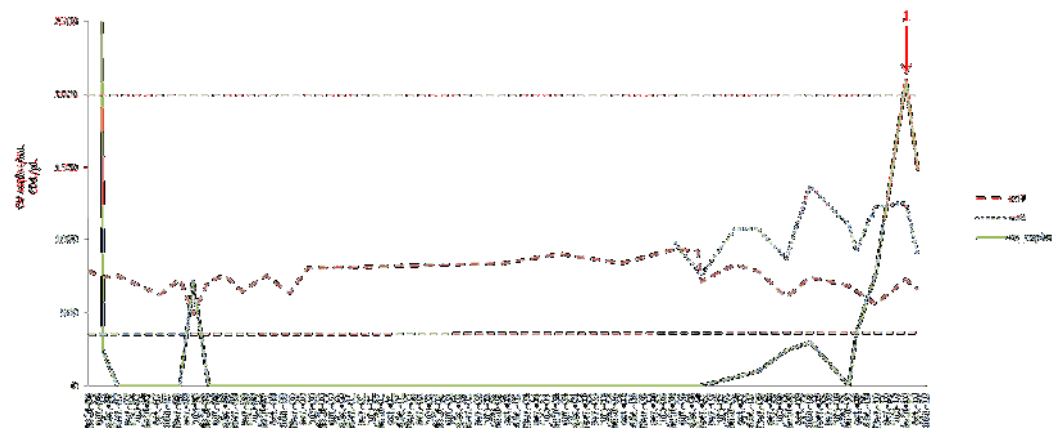
2 **A.**



4 **B.**



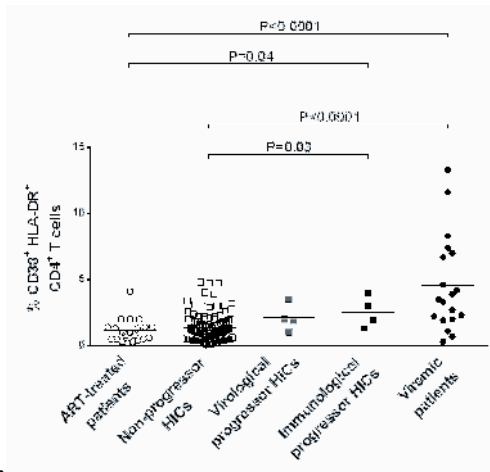
6 **C.**



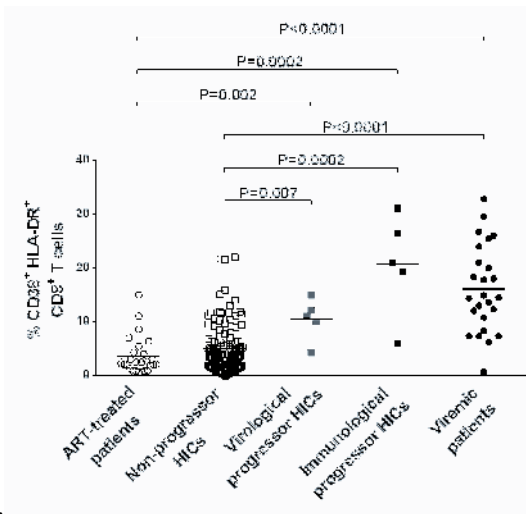
1 **Figure 3.**

2

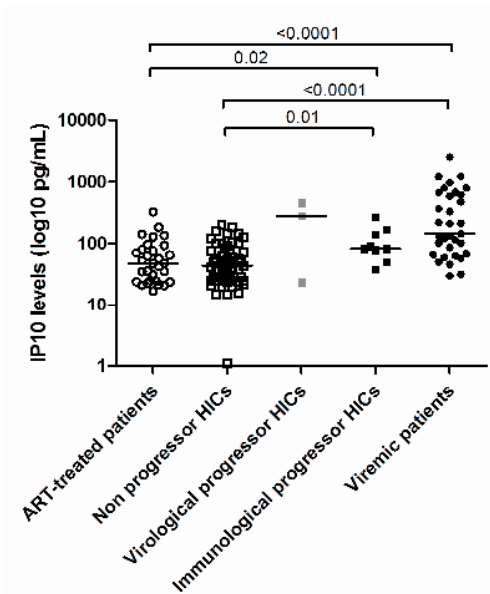
3



4 **A.**



5 **B.**



6 **C.**

7

1
2
3

1
2

SUPPLEMENTAL MATERIAL

Supplemental Table 1. Characteristics of the CD4 T cell count and the HIV RNA viral load at the time of confirmed immunological or virological progression

| | Confirmed immunological progression N=10 | Confirmed virological progression n=5 |
|---|--|---|
| CD4 T cell count (/mm ³) | 320 [301-336] | 725 [530-759] |
| Ultra-sensitive HIV RNA (copies/mL) | 132 [39-858] | 2210 [2119-3085] |
| Results are shown in median [1st-3rd interquartile range] | | |

3

DISCUSSION

EXISTENCE D'UNE INFLAMMATION NON CONTROLEE CHEZ LES PATIENTS HIV CONTROLLERS

Lors du **Travail n°1**, nous avons mis en évidence le fait que les patients HIV controllers, en dépit d'une charge virale faible, présentaient une production accrue de certaines cytokines et chimiokines inflammatoires, en particulier IP10, TNF α et le marqueur d'activation monocytaire CD14 soluble. Cette inflammation persistait dans le temps et était associée à des taux de CD4 bas. Ces observations ont soulevé de nombreuses questions, renvoyant à la génèse de l'inflammation et aux mécanismes de la baisse des LT CD4 au cours de l'infection par le VIH.

En effet, comme nous l'avons décrit, l'activation immunitaire chronique et l'inflammation en résultant sont des faits connus au cours de l'infection par le VIH, en particulier chez les patients virémiques. Notamment, les taux circulants d'IL6, de CRP ultra-sensible et de marqueurs d'activation de la coagulation ont été les premiers à être associés à la morbidité et la mortalité des patients, en lien avec la charge virale ARN du VIH et l'activation immune (Boulware et al., 2011; French et al., 2009; Kuller et al., 2008; Rodger et al., 2009). Cependant, il a pu être montré que chez les patients traités, cette inflammation diminuait mais ne retournait pas au même niveau que les personnes non infectées (Bastard et al., 2012; French et al., 2009; Hsue et al., 2009).

Ceci renvoie au fait que malgré une CV VIH indétectable sous traitement antirétroviral, certains patients ne reconstituent pas complètement leurs lymphocytes T CD4 circulants (Hunt et al., 2008; Kamat et al., 2010), parallèlement au maintien d'une activation lymphocytaire importante (Hunt et al., 2008). **Il semble ainsi que le poids de facteurs distincts de la réplication virale en tant que tel, soient impliqués dans**

l'établissement de l'activation/inflammation. Nos résultats vont dans ce sens, en montrant que :

- (i) les patients strictement indétectables de notre étude, à savoir les patients « elite controllers » (n'ayant jamais présenté de blips de réplication virale), et les patients contrôlés sous traitement ARV, présentaient des taux d'IP10 et de TNF α supérieurs à ceux des personnes non infectées
- (ii) il n'existait pas de corrélation directe entre la charge virale plasmatique (en ARN) et le taux de cytokines ou chimiokines circulantes
- (iii) il existait des différences dans l'expression des biomarqueurs des patients sous ARV et des elite controllers – pourtant similaires en terme de charge virale, avec en particulier des taux d'IL6 et d'IL10 plus élevés chez les patients traités.

PROFIL D'EXPRESSION CYTOKINIQUE DES HICs ET CAUSES SUGGEREES

Afin de déterminer les facteurs concourant à l'établissement et au maintien d'une inflammation systémique chez les patients HIV controllers, nous avons tout d'abord analysé le « profil » de production de cytokines/chimiokines chez les patients HIV controllers de notre étude.

Nous avons ainsi observé que les taux de TNF α étaient similaires chez les patients virémiques et les HIV controllers (qu'ils soient elite ou qu'ils aient présenté des blips de réplication virale). Par ailleurs, les taux de CD14 solubles étaient superposables entre les patients HIV controllers ayant présenté des blips (non-elite HICs) et les patients indétectables sous traitement ou virémiques chroniques. Ces reflets de l'inflammation ont été décrits au cours du VIH comme associé à la réplication virale (Aukrust et al., 1999; Cozzi-Lepri et al., 2011; Marchetti et al., 2011). Néanmoins, ils n'étaient pas

corrélés à la charge virale ARN ultra-sensible chez les HICs étudiés. Cependant, nous n'avons pas pu analyser la production de ces cytokines dans les ganglions ou la muqueuse digestive, ni rechercher une réplication virale tissulaire à bas bruit. La présence du virus VIH a été montrée dans les tissus de patients sous ART (intestin, ganglion) et dans le rectum de patients HICs (Hatano et al., 2010, 2013a). En parallèle, des réponses immunes souvent plus puissantes que celles détectées dans le sang ont été retrouvées dans le GALT (Shacklett and Ferre, 2011). La régulation de la production des marqueurs d'inflammation dans les tissus est sans nul doute complexe et différente selon les organes et les marqueurs analysés. De nombreux acteurs en dehors de la réplication virale *stricto sensu* sont impliqués. (Ferre et al., 2009; Shacklett and Ferre, 2011; Yukl et al., 2014).

L'équipe d'Irini Sereti a publié, de manière concomitante à notre étude, un travail d'analyse des cytokines et chimiokines reflétant l'inflammation et l'activation immunitaire « innée » - notamment, monocytaire – chez les patients HIV controllers (Krishnan et al., 2014). Leurs résultats montraient que les « elite controllers » (ARN VIH < 50 copies/mL) avaient des taux plus élevés de biomarqueurs inflammatoires (IL6, CRP ultra sensible) et d'activation de la voie de la coagulation (facteur tissulaire, D-Dimères) que les témoins non infectés. Les marqueurs procoagulants les différencient également des patients indétectables sous traitement. Nous n'avons pas pu étudier les taux de D-Dimères et de facteur tissulaire du fait de la nécessité de plus grandes quantités de plasma. Nous avons observé que les taux d'IL6 – de même que les taux d'IL10 – étaient moins élevés chez les patients controllers que les patients sous traitement dans notre étude, et nous avons suggéré que cela puisse être lié à une inflammation résiduelle plus importante chez les patients sous ART, en rapport avec l'exposition à une forte

réplication virale préalable à l'introduction du traitement, et des dommages tissulaires préalables plus importants (Brenchley et al., 2006). Nous n'avons, dans notre étude, pas observé de différence dans les taux de CRP ultra-sensible entre les différents groupes de patients, comme cela a pu être évoqué dans d'autres études (Bastard et al., 2012; Pereyra et al., 2012).

Nous avons observé que, chez les HICs, plusieurs biomarqueurs (IP10, IL6, CD163 soluble, MCP1) étaient associés à l'expression des marqueurs d'activation lymphocytaire T CD4 et CD8 (HLA-DR et CD38). Par ailleurs, l'activation du compartiment monocytaire et son rôle dans l'activation immunitaire et l'inflammation sont de plus en plus analysés depuis les dernières années, et nous avons montré que les taux de CD14 et de CD163 solubles chez les HICs étaient inversement corrélés au nombre de LT CD4 circulants. Concernant les HICs, Pereyra *et al* montrent que le contingent de monocytes activés CD14^{lo}CD16⁺ est associé au risque d'athérosclérose, parallèlement aux taux de CD163 soluble (Pereyra et al., 2012). Plus encore, Krishnan *et al* (Krishnan et al., 2014) montrent que, comparativement à des témoins sains, les patients elites ont plus de monocytes CX3CR1⁺ (ayant un rôle dans la migration tissulaire et le risque d'athérosclérose) et moins de monocytes CCR2⁺ (impliqués dans la clairance des pathogènes).

L'altération des barrières muqueuses est responsable d'une translocation des produits bactériens et, entre autre, de la production de cytokines/chimiokines par les monocytes activés en réponse à l'engagement de la voie du LPS/TLR4 (Brenchley et al., 2006; Marchetti et al., 2011). L'étude de Krishnan *et al* montre que les monocytes des elites s'activent plus en réponse au LPS et activent l'endothélium, en produisant de plus

grandes quantités de facteur tissulaire et d'IL1 β (Krishnan et al., 2014). Si nous n'avons pas pu étudier le phénotype des monocytes conjointement à l'étude des biomarqueurs, nous avons voulu analyser les liens avec d'autres marqueurs de translocation microbienne. Le dosage du LPS nécessitant des tubes spécifiques sans endotoxine, nous avons choisi de quantifier l'ADN ribosomal 16S bactérien (Kramski et al., 2011), sans mettre en évidence de corrélation directe entre les taux de cytokines/chimiokines et la translocation microbienne (donnée non publiée).

Les patients HIV controllers présentent ainsi des marqueurs d'inflammation élevés sans lien direct avec la charge virale du VIH ou la translocation bactérienne. L'activation monocytaire est en outre un phénomène important à caractériser chez les patients controllers.

IP10 COMME BIOMARQUEUR D'INFLAMMATION CHEZ LES PATIENTS HIV CONTROLLERS

Nous avons pu montrer que le biomarqueur permettant le mieux de distinguer les HICs des personnes non infectées comme des autres patients infectés est IP10. Notamment, nous avons observé que cette production d'IP10 était stable dans le temps, avec des taux similaires entre le dosage à l'inclusion dans la cohorte, à 1 an et à 2 ans. Cette expression n'était pas corrélée à la charge virale ou au taux d'ADN viral cellulaire (reflétant les réservoirs viraux), mais était associée à l'expression des marqueurs d'activation immunitaire T CD4 et CD8.

IP10 est une C-X-C chimiokine dépendante de l'engagement de la voie des Interférons de type I et III (Stylianou et al., 2000) – il s'agit en ce sens d'un ISG. Elle est produite par de multiples cellules, incluant les monocytes et les lymphocytes activés, mais également les

neutrophiles, les éosinophiles ou certaines autres cellules épithéliales (Liu et al., 2011). Elle interagit avec le récepteur CXCR3, exprimé à la surface des cellules de l'immunité comme les lymphocytes T et B activés, les cellules NK, les cellules dendritiques et les macrophages.

Une des premières fonctions de l'interaction IP10/CXCR3 est donc une fonction de chimiotactisme des cellules exprimant CXCR3 vers le site de production principal de la chimiokine. Dans le cadre de la pathologie associée au VIH, il a été montré dès le milieu des années 1990 que cette chimiokine était impliquée dans le développement de l'encéphalopathie (Sanders et al., 1998; Sasseville et al., 1996), l'alvéolite CD8 (Agostini et al., 2000) et la baisse des CD4 (Stylianou et al., 2000). Dans ces situations, IP10 semble produit par les astrocytes, les cellules pulmonaires et les cellules immunitaires en réponse indirecte (IFN α et γ - médiée) à la présence du virus dans les ganglions ou le système nerveux central, permettant le recrutement – notamment – de lymphocytes T CD8+CXCR3+ au site inflammatoire. Une autre fonction évoquée dans le cadre de la pathologie associée au VIH est un rôle dans l'induction de la réplication virale au sein des cellules CXCR3+. Lane et al. (Lane et al., 2003) ont ainsi montré par un modèle *in vitro* que l'apport d'IP10 augmentait la transcription de VIH au sein de macrophages dérivés de monocytes et de cellules mononuclées sanguines, suggérant un intérêt – non confirmé depuis – du blocage de l'axe IP10/CXCR3 afin de réduire la progression de la maladie. Enfin, IP10 exerce une fonction d'apoptose sur les cellules CXCR3+. Ceci a par exemple été montré dans un modèle d'encéphalite SIV, où la production d'IP10 par les astrocytes était responsable d'une apoptose neuronale par un mécanisme d'activation de la caspase-3 (Sui et al., 2004) et de mouvements calciques intracellulaires (Sui et al., 2006). Dans cette optique, un rôle d'IP10 dans l'exhaustion, l'hypofonctionnalité ou

l'apoptose des lymphocytes T CD4 activés peut également être évoqué (Ramirez et al., 2014).

Différentes études de patients en primo-infection (Jiao et al., 2012; Liovat et al., 2012) ou en phase chronique de la maladie (Kamat et al., 2010; Malherbe et al., 2014; Stylianou et al., 2000) ont ainsi mis en évidence que des taux plus élevés d'IP10 étaient associés à un taux plus bas de CD4 ou à un défaut de restauration immunitaire sous traitement. De même, il a été montré que les taux d'IP10 étaient associés à une charge virale plus élevée (Berenguer et al., 2012; Jiao et al., 2012; Liovat et al., 2012) et que la production de cette chimiokine se situait sous la dépendance de la voie TLR7/9 et IFN type I (Simmons et al., 2013; Stylianou et al., 2000). Enfin, certains auteurs ont proposé que le taux de cette molécule puisse être proposé comme marqueur prédictif de l'évolution de la maladie (Liovat et al., 2012).

REGULATION DE LA PRODUCTION D'IP10 : PERSPECTIVES DE TRAVAIL

Nous avons donc suggéré qu'IP10 était un marqueur pouvant refléter l'état d'inflammation des patients HIV controllers, de manière indirectement liée à la charge virale VIH ou l'inflammation muqueuse, mais sous la dépendance de l'activation immunitaire cellulaire et de l'engagement de la voie de l'Interféron.

Une étude plus précise de la régulation de la production d'IP10 au cours du VIH, et chez les patients HIV controllers en particulier, est importante. Ainsi, l'analyse de la production d'IP10 au sein des sous-populations lymphocytaires Th1, Th17 ou T régulatrices, ainsi que des monocytes ou les autres cellules du système immunitaire, est nécessaire. Par ailleurs, l'analyse des liens avec les différents stimuli mentionnés

(IFN, LPS, peptides viraux) permettrait de mieux comprendre ses mécanismes de contrôle.

Il a pu être montré dans le modèle d'infection par le VHC, que deux isoformes d'IP10 étaient retrouvés, tant au niveau plasmatique qu'au niveau tissulaire (hépatique)(Casrouge et al., 2011; Ragab et al., 2013). Une forme courte d'IP10 est un « antagoniste » de la forme longue naturelle, responsable du homing des lymphocytes CXCR3+. Un défaut de forme courte d'IP10 pourrait être responsable d'un excès de recrutement lymphocytaire et d'inflammation chez les patients infectés par le VIH, associé à une plus grande diminution des lymphocytes T CD4. Cette forme courte d'IP10 est obtenue après clivage par la dipeptyl-peptidase 4 (DPP4), dont une forme soluble ainsi que l'activité biologique sont quantifiables. Les relations entre l'activité de la DPP4 soluble et le ratio des formes courtes et longues d'IP10 est en cours dans un travail collaboratif avec l'équipe du Dr Michaela Müller-Trütwin chez les patients de la cohorte déjà étudiés pour l'analyse des biomarqueurs, en lien avec les paramètres d'activité immunitaire et l'évolution de leurs CD4.

Enfin, la régulation de l'action d'IP10 est également dépendante de son récepteur, CXCR3, à la surface des lymphocytes T. Ainsi, il existe trois formes de CXCR3 – CXCR3-A, CXCR3-B et CXCR3-alt, résultant de variants d'épissage et se liant différemment à IP10 (Aksoy et al., 2006). CXCR3-A et CXCR3-alt sont fréquemment coexprimés et sont responsables des effets de prolifération cellulaire et de homing lymphocytaire au site infecté. A l'inverse, l'engagement de CXCR3-B, en réponse à IP10, semble avoir un effet anti-prolifératif (Liu et al., 2011). Au cours du VIH, il a été suggéré que chez les patients virémiques, un défaut de l'expression de CXCR3 était associé à une progression plus rapide de l'infection, par un défaut de recrutement lymphocytaire T au niveau des

ganglions (Brainard et al., 2007). Ces patients présentant de faibles niveaux de CXCR3 présentaient ainsi des charges virales plus élevées et des taux de CD4 plus bas. Néanmoins, ces données sont contradictoires, d'autres auteurs évoquant que l'expression de CXCR3 augmente avec l'infection à la surface des LT CD8 circulants (Kimball et al., 2011), en rapport avec l'activation immunitaire. Le rôle de CXCR3 et, surtout, de l'expression de ses variants d'épissage, en lien avec les isoformes d'IP10 et les paramètres d'inflammation et d'activation immunitaire, pourrait être intéressant afin d'analyser leurs comportements lors de diverses phases de l'infection.

Ces observations concernant le rôle potentiel d'IP10 chez les patients HIV controllers renvoient également aux interactions entre la voie de l'Interféron et l'activation immune et l'inflammation au cours de l'infection par le VIH.

ROLE DE LA VOIE DES IFN/ISGs DANS L'ACTIVATION IMMUNE ET L'INFLAMMATION OBSERVEE CHEZ LES PATIENTS HIV CONTROLLERS

Dans le travail n° 2, nous avons utilisé une autre approche d'étude de la voie des interférons par l'analyse de l'expression de certains ISGs au sein de LT CD4, LT CD8 et monocytes circulants chez les patients HIV controllers, comparativement à d'autres patients infectés à différentes phases de l'infection.

IMPACT DE LA CHARGE VIRALE VIH DANS LA REGULATION DE LA PRODUCTION D'ISGs

Dans un premier temps, nous avons observé un effet lié à la réplication virale sur l'expression de plusieurs ISGs analysés (*ifitm1*, *pkr*). En effet, ces deux ISGs étaient plus élevés chez les patients virémiques que chez les témoins sains, indépendamment du type cellulaire analysé. Cette observation est consistante avec celles de la littérature. En

effet, de multiples études montrent une augmentation de l'expression de gènes induits par l'interféron, qu'elles aient été conçues par des analyses de transcriptomiques (Hycza et al., 2007; Krishnan et al., 2014; Rodger et al., 2009; Smith et al., 2010) ou en mesurant des gènes induits pris isolément en PCR quantitative (Hardy et al., 2013), chez les patients virémiques, par opposition à des patients ayant une virémie indétectable (sous traitement ou non). Notamment, les travaux de Hycza *et al* (Hycza et al., 2007) avaient permis de caractériser l'expression d'ISGs par une approche transcriptomique confirmée en PCR quantitative et révélaient que le niveau d'expression variaient en fonction du niveau de contrôle viral (les témoins sains et les LTNPs formant un groupe distinct des patients virémiques).

Nous avons ainsi observé que, chez les patients HIV controllers, le niveau d'expression des ISGs était, exception faite d'*ifitm1*, globalement superposable à celui des témoins non infectés. Ce résultat est similaire aux données existantes dans la littérature, qui montrent une réduction de l'expression des ISGs chez les HICs comparativement aux patients virémiques (Hycza et al., 2007; Krishnan et al., 2014), suggérant que la production d'ISGs pouvait être en partie dépendante de la charge virale et non nécessairement responsable du contrôle du virus.

Nous nous sommes cependant initialement interrogés sur le fait que les profils d'expression de tous les gènes n'était pas superposables (Figure 1, Article 2), afin notamment d'interpréter l'expression de ces ISGs chez les patients HIV controllers. Cette régulation distincte de l'expression de nos 4 ISGs repose en partie sur le choix des gènes que nous avons étudiés :

- *mxA* fait partie de la famille des GTPases. Les protéines MxA ont une activité antivirale tant cytosolique que intranucléaire en fixant la nucléocapside virale et en inhibant la

transcription et la réplication virale. Leur production est sous la dépendance exclusive des IFN de type I et, *a minima*, de type III, par l'engagement de STAT1, et n'est pas directement inductible par le virus (incluant le VIH) (Haller and Kochs, 2011).

-*pkr* est exprimé constitutivement dans tous les tissus à l'état inactivé et est inductible tant par les IFNs de type I et III que directement par les ARN viraux double brin. La protéine PKR empêche la traduction des protéines virales par la phosphorylation des protéines de la capsid, et a été plusieurs fois étudié au cours du VIH (Clerzius et al., 2011; Schneider et al., 2014)

-*ifitm1* joue un rôle antiviral en inhibant probablement la production du virus, par opposition aux autres membres de la famille IFITM (2 et 3) qui bloquent l'entrée cytosolique. *Ifitm1* est exprimé par de nombreuses cellules à l'état basal, et est inductible par les IFN de type I, mais également de type II ainsi que par les cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL6 (Diamond and Farzan, 2013; Lu et al., 2011; Schneider et al., 2014)

-*ifit1* présente une activité antivirale par des mécanismes variés. Il inhibe la traduction virale et la réplication en reconnaissant le 5' triphosphate et le défaut de méthylation en 2'-O des ARN viraux (influenza, coronavirus). En dehors de son induction par l'IFN de type I, il peut être induit par le virus directement *via* IRF3, appartenant en ce sens à la famille des viral-stress inducible genes (VSIGs) (Diamond and Farzan, 2013)

Nos observations soulignent donc la complexité de la régulation de chaque gène choisi, en fonction de ses capacités d'induction directes par le virus (*pkr*, *ifit1*), ou bien exclusivement par la voie de l'Interféron (*mxA*) ou encore par des mécanismes dépendant de l'état d'activation immunitaire et d'inflammation (*ifitm1*), expliquant ainsi l'hétérogénéité des corrélations avec la charge virale ARN du VIH. Ces constats

pourraient expliquer qu'il existe une corrélation directe entre la charge virale et le niveau de certains ISGs (ex : *pkrr*) chez les patients infectés, et que celle-ci soit moins systématique pour d'autres ISGs étudiés.

Ainsi, la production des ISGs est le résultat de l'action conjointe du virus et de plusieurs facteurs dépendant du type cellulaire (état d'activation cellulaire et environnement inflammatoire, sensibilité à l'IFN de type I ...).

SUREXPRESSION D'*IFITM1* CHEZ LES HICs ET LIENS AVEC L'ETAT D'ACTIVATION IMMUNITAIRE

De manière intéressante, nous avons observé qu'*ifitm1* était le seul gène étudié significativement plus élevé au sein des LT CD4 des HICs que des témoins sains, en dépit d'une charge virale indétectable. En outre, si aucune corrélation entre le niveau de charge virale ARN du VIH et le niveau d'expression d'*ifitm1* n'était retrouvée, des corrélations positives avec les marqueurs d'activation cellulaire étaient présents. Ainsi, considérant tous les patients infectés, l'expression d'*ifitm1* au sein des T CD4 et T CD8 était liée à l'activation HLADR+CD38+ des LTCD4 et LTCD8, respectivement. De même, l'expression d'*ifitm1* au sein des monocytes était liée aux taux de CD14 soluble. Ceci est en lien avec la description donnée ci-dessus des mécanismes de régulation d'*ifitm1*, partiellement sous la dépendance de l'état d'inflammation/activation (Diamond and Farzan, 2013), et à l'instar de ce qui est décrit pour d'autres facteurs de restriction (Raposo et al., 2013).

Plus encore, le lien entre activation T CD4 et niveau d'expression d'*ifitm1* était conservé en ne considérant que les HICs, suggérant un rôle spécifique de la protéine IFITM1 chez ces patients, en association avec le faible niveau d'activation résiduelle.

Cette observation renvoie à l'étude des facteurs de restriction du VIH et leur rôle potentiel dans les mécanismes de contrôle anti-viral des patients HIV controllers. Parmi

les facteurs de restriction étudiés ces dernières années, il a pu être montré que la pression exercée par TRIM5 α pouvait jouer un rôle important chez les patients porteur de l'allèle HLA B57 (Granier et al., 2013). Récemment, Abdel-Mohsen *et al* ont décrit que *schlafen11*, un facteur de restriction agissant en inhibant la synthèse protéique virale, était présent à des niveaux équivalents dans les LT CD4 des patients elite controllers et des témoins non infectés, de manière significativement plus élevée que chez des virémiques ou des patients sous ARV (Abdel-Mohsen et al., 2013). De la même manière, une étude très récente montre que l'expression de *samhd1*, un facteur de restriction jouant en régulant le pool de nucléotides triphosphates disponibles (Laguette et al., 2011), est accrue dans les CMSPs des elite controllers comparée à celle chez des patients progressseurs (Riveira-Muñoz et al., 2014). Ce résultat reste néanmoins à confirmer car il n'a pas été retrouvé par nos collaborateurs (Asier Saez-Cirion, données non publiées).

Dans ce contexte, il semble important d'analyser le rôle d'*ifitm1* comme facteur de restriction potentiel du VIH. Lu *et al* ont montré que les protéines IFITMs, au nombre de 3, avaient un rôle dans la restriction *in vitro* de la production du virus (Lu et al., 2011). Les protéines IFITM2 et 3 bloquent l'entrée du virus, et IFITM1 pourrait jouer un rôle en régulation la production de *gag*. D'autres équipes ont montré que les propriétés des protéines IFITMs (notamment, l'état de palmitoylation) était différentes dans leur rôle anti-VIH et dans la défense contre d'autres virus, tels la grippe (Chutiwitoonchai et al., 2013). Enfin, un équilibre entre la quantité de virus et celle d'IFITM1 est important pour maintenir le rôle de facteur de restriction de ces protéines. En effet, le virus, par un mécanisme dépendant de Vpu, est capable de dépasser les capacités de restriction d'IFITM1, à l'instar de ce qui est décrit des interactions Vif-APOBEC3G ou Vpx-SAMHD1 (Ding et al., 2014).

Ifitm1 a souvent été analysé par des techniques de transcriptomique visant à étudier la signature Interféron globale, et apparaissait alors en lien avec le reste du profil d'expression génique, uprégulé chez les patients virémiques et downrégulé ou similaire aux témoins non infectés chez les patients controllers (Hyrca et al., 2007; de Masson et al., 2014; Rotger et al., 2010, 2011). Notre analyse suggère qu'*ifitm1* pourrait être induit au sein des LT CD4 des HICs en réponse à l'état d'activation immunitaire résiduel chez ces patients. Nous ne pouvons, sur la base de cette étude, tirer aucune conclusion précise quant à son éventuel rôle de facteur de restriction impliqué dans le contrôle antiviral chez les HICs. Néanmoins, cette hypothèse est intéressante et pourrait s'inclure dans le phénotype de contrôle antiviral naturel de certains HICs, n'exprimant pas d'autres corrélats de protection (ex : HICs ne portant pas l'allèle HLA B27 ou B57).

La caractérisation précise du rôle d'*ifitm1* chez les patients HIV controllers est importante, en lien avec l'étude du rôle de l'activation lymphocytaire T et monocytaire.

ROLE DE L'ACTIVATION DU COMPARTIMENT MONOCYTAIRE

Nous avons choisi d'analyser l'expression des ISGs au sein de trois-sous populations cellulaires. Cette méthode nous a permis d'aborder cette problématique de manière distincte des autres études de la littérature. En effet, l'essentiel des études jusqu'à présent analysait, soit l'expression quantitative de certains ISGs donnés dans les PBMCs totaux ou les CD4 / CD8, soit des profils d'expression géniques par analyse transcriptomique au sein des T CD4, T CD8 ou monocytes (Rotger et al., 2010; Wu et al., 2011, 2013a, 2013b). Nous avons voulu quantifier l'expression des ISGs dans les

monocytes, comparativement notamment aux LT CD4 (ces deux populations cellulaires expriment le corécepteur d'entrée CD4).

Les études récentes dans les groupes de patients non-progresseurs à long terme ont permis de montrer des distinctions dans leur signature monocytaire comparativement aux patients virémiques progresseurs (Wu et al., 2013b). En particulier, les patients virémiques présentaient une diminution des gènes associés aux voies impliquant les TLR, JAK-STAT ou du cycle cellulaire par opposition aux LTNPs.

Pour notre part, nous avons observé que l'expression d'*ifitm1* au sein des monocytes était associée au taux de CD14 soluble, considérant tous les patients inclus. Ce résultat est dans la lignée de l'analyse du rôle d'IP10. En effet, outre l'aspect « bénéfique » de l'inflammation permettant d'induire des potentiels facteurs de restriction, l'activation excessive du comportement monocytaire et les taux élevés d'ISGs (IP10 et *ifitm1*, dans nos travaux) sont associés à des taux plus bas de LT CD4.

Cette interaction entre les gènes induits par l'interféron et l'activation monocytaire a été soulignée récemment (Xu et al., 2014). Ainsi, *Ly6e*, un gène partiellement induit par l'IFN, est capable de moduler négativement l'expression de CD14 et de réduire l'hyperactivation induite par le LPS dans le contexte de la translocation de produits microbiens.

Ainsi, de nombreuses voies de régulation des monocytes et des ISGs existent et doivent être approfondies dans le but de contrôler l'activation immune et l'inflammation chez les patients HIV controllers.

ANALYSE D'AUTRES FACTEURS DE REGULATION DE LA PRODUCTION D'ISGs

Comme nous l'avons suggéré plus haut, la régulation des gènes induits par l'interféron est complexe et dépend de l'action conjointe du virus et de plusieurs facteurs dépendant du type cellulaire : production d'IFN de type I et sensibilité à cette cytokine, état d'activation cellulaire et environnement inflammatoire, signalisation intracellulaire...

Nous n'avons pas choisi de doser la quantité d'IFN α plasmatique chez les patients étudiés, bien qu'il eût été intéressant d'analyser le poids relatif de cette cytokine par rapport à la charge virale VIH et à l'inflammation comme responsables de la production d'ISGs. Le lien entre les taux plasmatiques d'IFN type I et ses conséquences biologiques est débattu, entre autre du fait de sa faible quantité mesurable, et de concentrations bien plus faibles que celles utilisées *in vitro* pour étudier son effet sur les cellules. L'équipe de Michael Ledermann a quant à elle utilisé le dosage de l'activité plasmatique de l'IFN de type I (Hardy et al., 2013), montrant ainsi que cette activité était corrélée aux taux plasmatiques d'IFN type I, à la charge virale VIH, l'intensité d'expression de CD38 à la surface des LT CD8 mémoires, et inversement au taux de CD4. Cependant, cette bioactivité était mesurée en équivalent d'unités d'IFN α 2, et ne reflète pas l'intégralité des effets des sous types d'IFN α , et ne prend pas non plus en compte les autres IFN de type I. Enfin, le dosage de l'IFN de type I en tant que tel n'est pas le meilleur reflet des effets biologiques de cette cytokine, car sa production se situe probablement plus au niveau des organes lymphoïdes qu'en périphérie (Harris et al., 2010; Jacquelin et al., 2009).

Nous avons voulu analyser si la capacité de chaque type cellulaire à répondre à l'Interféron jouait un rôle sur l'expression des ISGs, et si ce niveau de régulation avait un

impact chez les patients HIV controllers. Cette analyse partait de l'hypothèse que chez les patients infectés chroniquement, les cellules de la lignée monocyttaire étaient moins sensibles à la restimulation par l'Interféron, expliquant un moindre effet anti-viral de cette cytokine (Hardy et al., 2009). Nous avons donc étudié le niveau d'expression du récepteur à l'IFN de type I à la surface des cellules analysées.

Le récepteur à l'IFN de type I est un hétéro-dimère (IFNAR1/2). Le récepteur de type 1 est exprimé à la surface des cellules, permet la reconnaissance de divers sous-types d'IFN de type I et la transduction de signal *via* Tyk2 et STAT1/2. A l'inverse, le récepteur de type 2 existe sous plusieurs isoformes, dont certaines (IFNAR2b) jouent un rôle inhibiteur des effets de l'IFN de type I. En outre, il existe une isoforme soluble d'IFNAR2, rendant complexe l'étude de cette sous-unité.

Nous avons donc choisi de ne quantifier que l'expression d'IFNAR1 membranaire. Pour ce faire, nous avons, pour chaque prélèvement des patients inclus dans la Travail n°2, effectué un marquage sur sang total combinant des anticorps anti-IFNAR au mélange d'anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8 et anti-CD14 utilisé. Un contrôle par isotype était utilisé par ailleurs, afin de quantifier en cytométrie de flux la moyenne d'intensité de fluorescence spécifique du récepteur IFNAR. Hardy *et al* avaient montré que l'expression d'IFNAR1 était réduite chez les patients virémiques en phase chronique à la surface des monocytes, et que cette expression était inversement corrélée à la charge virale du VIH (Hardy et al., 2009). Ils montraient également que l'expression de pSTAT1 était réduite dans les monocytes des patients, justifiant leur moindre réponse à l'IFN. Notre hypothèse *a priori* était que les HICs avaient une expression d'IFNAR1 supérieure à celle des patients virémiques, leur permettant de mieux répondre à l'infection – ou à des épisodes de blips de répllication – par un effet rapide et résolutif de l'IFN de type I,

poursuivant l'idée d'une voie fonctionnelle de l'IFN de type I à l'instar des résultats obtenus sur l'étude des pDC (Barblu et al., 2012; Machmach et al., 2012).

Nos résultats n'ont pas permis de montrer de différence dans l'expression d'IFNAR1 à la surface des LT CD4, LT CD8 ou monocytes dans les 4 groupes de patients étudiés (**Figure 16**).

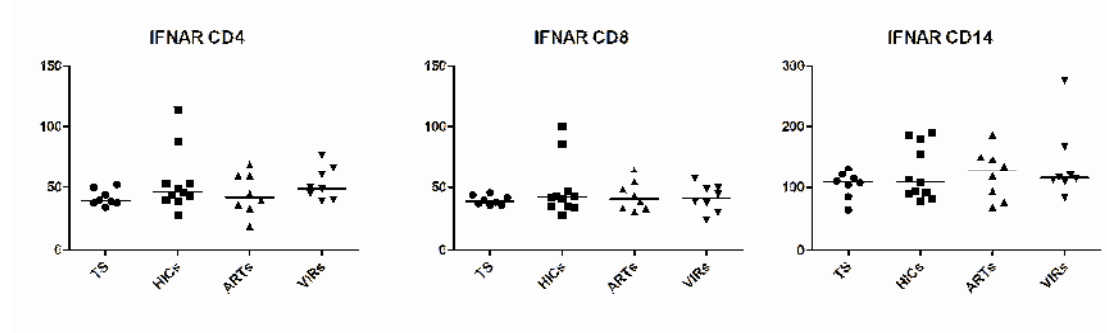


Figure 16. Expression membranaire du récepteur à l'IFN de type I IFNAR1 selon les différents types cellulaires (LT CD4, CD8 et monocytes circulants) des patients virémiques, sous traitement ou HIV controllers, comparativement aux témoins sains (TS). Expression en médiane d'intensité de fluorescence.

Il est possible, d'une part, que le nombre de patients inclus ait été trop faible pour assurer la puissance nécessaire à ce type d'analyse. D'autre part, les patients virémiques inclus étaient probablement différents (multiples comorbidités, infections opportunistes) de ceux inclus dans l'étude de Hardy, nous empêchant de reproduire leurs résultats. Néanmoins, cette ouverture reste intéressante et mérite d'être analysée de manière plus approfondie.

LIMITES ET PERSPECTIVES CONCERNANT L'ETUDE DES ISGs CHEZ LES HICs

Outre le nombre de patient inclus, plusieurs limites à notre étude des ISGs nécessitent d'être discutées. D'une part, le choix des ISGs analysés, bien que justifié (cf. ci dessus),

n'est pas exhaustif et limite les conclusions possibles. Une approche correcte eût été une approche transcriptomique, afin d'étudier un plus grand nombre de gènes et de permettre des analyses en clusters pouvant dégager des conclusions plus globales.

Concernant le choix d'autres ISGs éventuels à analyser en PCR quantitative, la question du rôle de certains ISG impliqués récemment comme facteurs de restriction du VIH (*samhd1*, *mx2*, *isg15*...) se pose (Goujon et al., 2013; Laguette et al., 2011). Nous n'avons pas pu encore amplifier le gène *ip10*, comme prévu initialement, au sein de ces diverses populations avec les amorces mises au point au laboratoire. Enfin, nous n'avons pas accès à des prélèvements profonds (muqueuse rectale, ganglions), qui auraient pu donner des informations importantes quant à la génèse de l'activation des voies de l'IFN de type I (Hycza et al., 2007; Jacquelin et al., 2009; Smith et al., 2010).

Parmi les perspectives, des études ultérieures visant à analyser la transduction du signal sous IFNAR et la régulation intracellulaire de la production des ISGs devront être réalisées, afin d'étudier, chez les patients HIV controllers :

- les capacités de réponse à l'Interféron des lymphocytes T et des monocytes
- les capacités de production des VSIGs (*pkr*, *ifit1*) en réponse à la stimulation virale directe (sans passer par les pDCs et la voie IFN)
- les voies de rétrocontrôle, par l'étude de l'expression des gènes *socs1* et *socs3*

En effet, ces études sont importantes, dans la logique actuelle d'essais de traitement par agonistes de l'Interféron, afin de faire la part des choses entre les risques d'une exposition au long cours à l'Interféron et les bénéfices attendus par son utilisation (Abdel-Mohsen et al., 2014; Azzoni et al., 2013).

Une meilleure maîtrise des liens entre faible charge virale, voie de l'Interféron, activation immune résiduelle et baisse des LT CD4 permettront également de préciser les raisons des échappements immuno-virologiques et les stratégies à adopter pour les anticiper.

EVENEMENTS DETERMINANTS LES PERTES DE CONTRÔLE AU COURS DU VIH

Dans ce contexte, nos résultats montrent que, même à charge virale très basse comme chez les elite controllers, les taux d'IP10 et de certains ISGs comme *ifitm1* restent anormalement élevés, sont corrélés à l'activation immunitaire ainsi qu'à des taux de lymphocytes T CD4 plus bas.

PLACE D'IP10 ET DES BIOMARQUEURS D'INFLAMMATION DANS L'ARSENAL DE SUIVI DES PATIENTS HIV CONTROLLERS

Nous avons montré dans le travail n°1 qu'IP10 était associé à un taux de LT CD4 significativement plus bas. A l'image de l'étude d'A-S Liovat (Liovat et al., 2012), la question d'un rôle « prédictif » d'IP10 dans la progression de la maladie chez les patients HIV controllers s'est posée. En particulier, cibler le poids de ce biomarqueur dans l'identification de patients à risque de progression immuno-virologique – et donc nécessitant précocement un traitement – nous semblait important.

La stratégie utilisée pour préciser la place des biomarqueurs dans l'arsenal de suivi peut être discutée. En effet, afin d'identifier une « signature » de biomarqueurs associée à un phénotype donné, beaucoup d'études – dont la nôtre – ont utilisé une approche multiplex permettant d'analyser plusieurs facteurs concomitamment. Cette stratégie multiplex présente plusieurs écueils :

-d'une part, le choix et le nombre de marqueurs analysés doit être justifié. Nous avons choisi de tester des cytokines et chimiokines en lien avec les données de la littérature (IL6, CRP ultrasensible), l'inflammation (TNF α), l'activation monocytaire (CD14 et CD163 solubles, MCP1), la voie de l'interféron (IP10), les voies de régulation (IL10). Nous aurions pu faire le choix d'autres marqueurs d'inflammation (récepteurs solubles du TNF, IL1, IL18...), de marqueurs de translocation bactérienne (LPS, endocAb) ou d'apoptose entérocytaire (I-FABP). Cependant, la technique utilisée (FlowCytoMix*) permettait la quantification simultanée de plusieurs biomarqueurs en utilisant des billes de deux tailles différentes et couplés à des anticorps anti-« biomarqueur » marqués par un fluorochrome de longueur d'onde prédéfinie. Ainsi, la combinaison de tous les biomarqueurs sus-cités n'était pas possible, soit pour des raisons techniques (incompatibilité de billes), soit pour des raisons commerciales (anticorps spécifique non développé)

-d'autre part, ces techniques multiplex imposent une analyse statistique stringente. En effet, les comparaisons entre groupes et entre cyto/chimiokine nécessitent de prendre en compte la multiplicité des comparaisons avec une correction statistique de type Bonferroni, qui a été respectée dans le travail n°1.

Si nous avons montré que les taux d'IP10 à l'inclusion étaient associés à des taux de LT CD4 plus bas, nous n'avons pas pu prouver ce rôle « prédictif » d'IP10, notamment dans la baisse des LT CD4 dans le temps. En effet, dans notre étude, seuls 8 des 70 patients HIV controllers inclus avaient une baisse cliniquement pertinente (i.e., patients inclus avec des LT CD4 > 500/mm³ et baissant à 1 ou 2 ans < 500/mm³). Cette faible fréquence d'évènements était superposable à celle des précédentes études faites sur la cohorte

(Boufassa et al., 2011), mais n'a pas permis la puissance nécessaire pour identifier IP10 comme facteur indépendant de progression immunologique chez ces HICs.

Dans ce contexte, nous avons tenté dans le travail n°3 de préciser la place d'IP10 et des marqueurs immuno-virologiques de suivi des patients HICs à risque de progression.

FREQUENCE D'ÉCHAPPEMENTS IMMUNOVIROLOGIQUES DANS LA COHORTE CODEX

Nous avons pu montrer que parmi les 217 premiers patients inclus dans la cohorte, 37 patients présentaient au moins un épisode de « pré-échappement » (soit virologique, avec une charge virale VIH > 2000 copies/mL, soit immunologique avec une baisse significative du taux de LT CD4 < 350/mm³, ou de plus de 200 CD4/mm³ par rapport au taux de base si celui-ci était < 600/mm³). Quinze patients ont présenté une confirmation de cet échappement sur un deuxième prélèvement consécutif, soit 10 échappements immunologiques et 5 échappements virologiques. Cette fréquence d'échappement concorde avec les études antérieures sur d'autres cohortes de patients controllers (Groves et al., 2012; Hunt et al., 2008; Madec et al., 2013; Okulicz et al., 2009). Okulicz *et al.* ont montré que 3/25 patients définis comme "elite controllers" (12%) devaient initier un traitement antirétroviral durant leur suivi (Okulicz et al., 2009). De même, Hunt *et al.* ont écrit que 3/30 de leurs patients controllers sur leur étude de 2008 (10%), avaient un taux de CD4 < 350/mm³ à l'inclusion dans l'étude (Hunt et al., 2008).

Récemment, la collaboration internationale CASCADE s'est intéressée à décrire l'évolution depuis la séroconversion de patients provenant de 24 cohortes au plan international (Madec et al., 2013). Dans cette étude, 140 patients HIV controllers ont été

identifiés, et Madec *et al* rapportent 22 pertes de contrôle virologique sur un suivi de 20 ans. Cette proportion de 15.7% est supérieure à celle observée dans la cohorte française, mais avec un suivi plus long. En effet, la probabilité estimée de maintien du contrôle anti-VIH semble être de 74% à 15 ans, tenant compte des données censurées par des analyses de Kaplan-Meier. Ce type d'analyse statistique n'a pas pu être pratiquée dans notre étude car nous avons estimé que, si la date de point d'analyse pouvait se situer au moment de l'échappement confirmé, ni la date du diagnostic d'infection par le VIH ni la date d'entrée dans la cohorte ne constituaient de bonnes dates de début de suivi – la date de diagnostic ne correspondant pas à une date de séroconversion dans CODEX.

ANALYSE DES CAUSES D'ÉCHAPPEMENTS IMMUNO-VIROLOGIQUES

Nous avons tout d'abord analysé si des événements cliniques étaient associés à des pertes de contrôle chez les patients controllers. Pour ce faire, nous nous sommes basés sur le rapport des événements déclarés par les patients et les médecins investigateurs de la cohorte CODEX, dans les cahiers d'investigations renvoyés au centre de méthodologie et de gestion. Cette méthodologie prospective sur la cohorte nous a permis d'être le plus exhaustif possible, en comparaison avec les analyses rétrospectives faites dans d'autres études de patients elite controllers.

Ainsi, deux patients parmi les 5 ayant présenté un échappement virologique ont rapporté avoir eu des relations sexuelles non protégées dans les mois précédant l'échappement. Il n'est pas possible de conclure à l'imputabilité directe de ces relations sexuelles, dans le sens où la proportion de HICs rapportant des relations sexuelles non protégées mais ayant conservé leur capacité de contrôle antiviral était similaire. Néanmoins, une hypothèse pourrait être, chez les patients en échappement, une

superinfection par un autre virus provoquant un dépassement des capacités de contrôle. Des superinfections ont déjà été documentées chez des patients HIV controllers dans la littérature, aboutissant parfois à des pertes de contrôle antiviral (Clerc et al., 2010). Dans d'autres études, ces superinfections provoquaient des blips transitoires de réplication virale sans provoquer de perte de contrôle prolongé (Lamine et al., 2007; Rachinger et al., 2008). Une analyse phylogénétique des virus infectant les patients en échappement virologique de notre étude n'a pas pu être réalisée mais est prévue.

Nous avons également analysé les paramètres immunovirologiques usuels à l'inclusion des patients dans la cohorte (taux de LT CD4, nadir de LT CD4, charge virale ARN ultrasensible). Cette inclusion est faite au moment du signalement de patients HIV controllers par les centres de suivi, répondant à la définition actuelle (suivi depuis au moins 5 ans avec les 5 dernières charges virales indétectables), et précède la date d'échappement d'un an ou deux en général. Dans cette analyse, nous avons observé que, à l'inclusion, une charge virale ultrasensible élevée était associée au risque d'échappement virologique, ce qui est concordant avec les données de CASCADE évoquant que des blips répétés sans retour à un contrôle antiviral sous le seuil de détection étaient associés à un risque de progression virologique, suggérant la notion de "blips pré-échappement" (Madec et al., 2013).

Dans le contexte des épisodes "d'échappement immunologique", nous avons identifié certains patients qui avaient présenté des infections bactériennes récurrentes préalables à la baisse des LT CD4. L'origine de ces infections récurrentes, non liée à un taux de lymphocytes plus bas chez ces patients, est probablement multifactorielle. Cependant, la survenue répétée de ces infections entraîne une hyperactivation du

système immunitaire pouvant favoriser les défauts d'homéostasie et une apoptose lymphocytaire T CD4 accrue.

Ainsi, nous avons pu observer que les taux d'IP10 et l'activation lymphocytaire T CD4 et T CD8 à l'inclusion des patients (1 à 2 ans avant l'échappement) étaient plus élevés chez ceux qui allaient présenter une progression immunologique, confortant les analyses faites dans le travail n°1.

Par ailleurs, le nadir de LT CD4, le taux à l'inclusion de LT CD4, l'existence de blips au cours du suivi et une charge virale ultra-sensible à l'inclusion plus élevée étaient associées au phénotype "échappeur immunologique". Ce constat renvoie aux causes possibles de baisse du taux de LT CD4 chez les patients HIV controllers. Comme nous l'avons décrit, la présence d'une charge virale VIH résiduelle, même faible, est associée à un taux de LT CD4 plus bas. Ceci a pu être montré dans la cohorte HIV controllers, entre autre par le fait que les patients ayant présenté des blips de réplication virale sont ceux chez qui la pente négative des LT CD4 est la plus importante (Boufassa et al., 2011). La présence d'une réplication virale à bas bruit a été démontré chez les HICs, tant par des mesures de charge virale ARN ultra-sensible dans le plasma (Boufassa et al., 2011; Hatano et al., 2009) qu'au niveau de la muqueuse rectale (Hatano et al., 2013b). Par ailleurs, quelques études ont montré que le virus infectant les patients controllers était capable d'évoluer au plan génotypique, soulignant la réplication du virus et impliquant une modification de la fitness virale et un échappement à la pression de sélection (Bailey et al., 2007; Blankson et al., 2007; O'Connell et al., 2010). Les liens entre l'importance de la réplication virale résiduelle et l'activation immunitaire T associée, ainsi que les phénomènes d'épuisement lymphocytaire et de défaut de renouvellement thymique

(Hunt et al., 2008; Sauce et al., 2011), expliquent probablement une partie du déclin des LT CD4 chez les controllers.

En 2014, ces questions de réplication virale résiduelle posent néanmoins trois questions

- (i) Quelle est la définition la plus adéquate des patients HIV controllers?
- (ii) Peut-on définir un phénotype de patients ayant toujours conservé une charge virale strictement indétectable?
- (iii) Quels patients HIV controllers doit-on traiter, et avec quel objectif?

Récemment en effet, plusieurs articles ont étudié la multiplicité des définitions des patients HIV controllers dans la littérature (Gurdasani et al., 2014; Olson et al., 2014).

Gurdasani et al, sur une analyse exhaustive de 501 études de la littérature, ont ainsi montré que les définitions données aux phénotypes « extrêmes » des patients infectés par le VIH étaient larges, se recoupaient pour certaines et rendaient parfois difficile une analyse comparative et critique de ces études (Gurdasani et al., 2014). Ainsi, les phénotypes de patients « elite controllers », « HIV controllers » ou « viremic controllers » correspondaient, respectivement, à 117, 54 et 32 définitions...

L'hétérogénéité de ces définitions était liée à la durée de suivi définie, au seuil considéré de charge virale, éventuellement au taux ou à l'évolution des LT CD4. Or, une harmonisation des définitions des patients étudiés et de leurs phénotypes de contrôle antiviral est indispensable afin de tirer des conclusions quant aux mécanismes de défense impliqués mais aussi quant à leur risque évolutif et la manière de les surveiller.

Dans le cadre des controllers, un suivi d'au moins 6 mois semble permettre d'identifier correctement ces patients. Les deux définitions permettant le plus d'homogénéiser leur

phénotype sont : un suivi d'au moins un an avec 3 charges virales ARN < 75 copies/mL, ou la définition préalablement utilisée sur l'Observatoire Français (suivi d'au moins 10 ans, avec au moins 90% des charges virales VIH < 400 copies /mL). Il est important de rappeler que cette définition « princeps » (Lambotte et al., 2005) a été délibérément élargie lors de la création de la cohorte HIV controller pour pouvoir étudier davantage de pertes de contrôle.

Dans ce contexte, la question se pose d'identifier d'éventuels patients avec un suivi long et n'ayant jamais eu de charge virale détectable pour connaître leurs caractéristiques. Ces patients existent : 53 dans la cohorte Codex. L'étude de ces patients, en lien avec les données épidémiologiques antérieures de la cohorte (Boufassa et al., 2011) et leur caractérisation immunologique (Hua et al., 2014; Lécureux et al., 2014; Sáez-Cirión et al., 2009) est actuellement en cours. Ces patients représentent ce que nous pourrions appeler une « guérison fonctionnelle » et déterminer leurs caractéristiques et leurs mécanismes de contrôle sont des enjeux importants mais les identifier permet aussi d'adapter les stratégies de surveillance ou de traitement.

STRATEGIES DE TRAITEMENT DES HICs ET REDUCTION DE L'INFLAMMATION

Dans notre étude, l'essentiel des patients ayant reçu un traitement antiretroviral l'a été sur l'argument de la baisse des CD4, plutôt que dans la situation d'un échappement virologique. Ce fait de « vraie vie » – les cliniciens en charge des patients HIV controllers de la cohorte ne recevant pas de consignes de traitement – reflète nos connaissances concernant la nécessité de traiter les patients infectés pour éviter le risque d'infections opportunistes (Hoen et al., 2014), et est retrouvé dans d'autres études (Hunt et al., 2008; Okulicz et al., 2009).

En France, les traitements anti-rétroviraux sont recommandés pour tout patient infecté par le VIH (Hoen et al., 2014), néanmoins, la question du moment de les introduire chez les patients controllers n'est pas résolue. Dans ce contexte, plusieurs équipes ont évalué le bénéfice de traiter les patients controllers, et l'effet sur les mesures de charge virale, circulante comme tissulaire (Hatano et al., 2013c; Okulicz et al., 2010). Hatano et al. ont ainsi traité de manière prospective 16 HICs asymptomatiques pendant 24 semaines. Cette stratégie a permis de diminuer significativement les taux de CV ultrasensible du VIH tant au niveau plasmatique que dans la muqueuse rectale, de manière parallèle aux marqueurs d'activation immunitaire mais il n'y a pas eu d'impact sur le taux de lymphocytes T CD4 ni sur les biomarqueurs solubles étudiés (Hatano et al., 2013c).

En colligeant des observations de différentes cohortes dont la cohorte ANRS, Boufassa et al. ont pu étudier 32 patients HICs recevant des ARV et ont montré que si la charge virale était toujours ramenée à l'indétectabilité sous traitement chez les HICs, la reconstitution immunitaire T CD4 était d'amplitude et de rapidité variable (Boufassa et al., 2014). Ces données suggèrent que certains HICs présentant une pente négative de leurs T CD4 associés à une activation immunitaire et une inflammation plus importante, pourraient bénéficier d'un traitement plus précoce.

De même, les patients HIV controllers plus exposés à une activation importante, sont à l'instar des patients progressifs, plus exposés au risque d'athérosclérose précoce (Hsue et al., 2009; Pereyra et al., 2012). Les données de la cohorte Française concernant les facteurs de risque cardiovasculaire traditionnels (diabète, dyslipidémie, tabagisme, surpoids) en lien avec les marqueurs d'activation immunitaire – notamment monocyttaire – n'ont pas encore été analysées. De même, ces données devront être étudiées en lien avec des marqueurs morphologiques de remodelage vasculaire (épaisseur intima-média artérielle, calcifications vasculaires coronaires) afin de cibler

quels patients bénéficieraient d'un traitement anti-rétroviral malgré des LT CD4 encore élevés.

Outre le traitement anti-rétroviral, des stratégies de réduction de l'inflammation chez les patients controllers peuvent également être envisagées sur la base de nos résultats. Nous mettons en évidence que les taux d'IP10 et l'activation de la voie de l'interféron sont associés à l'activation immunitaire *per se*. Dans ce contexte, un traitement utilisé depuis plusieurs années dans d'autres pathologies médiées par l'interféron (le lupus, par exemple) a été envisagé afin de réduire l'activation excessive de cette voie : l'hydroxychloroquine. Dans le cadre de l'infection par le VIH, cette molécule a montré *in vitro* sa capacité à réduire la réplication virale (Naarding et al., 2007; Pardridge et al., 1998) de même que l'activation de la voie interféron par voie endosomale (Martinson et al., 2010). Parmi les essais cliniques effectués chez les patients, les premiers – avant l'ère des trithérapies – suggéraient un bénéfice sur la réduction de charge virale VIH plasmatique avec un maintien du taux de LT CD4 circulants et une réduction des taux d'IL6 (Sperber et al., 1995). Plus récemment, Piconi et al ont analysé les effets de l'hydroxychloroquine à sa dose usuelle (400 mg/j) sur l'évolution des LT CD4 de patients traités par ARV, répondeurs virologiques mais non répondeurs immunologiques (Piconi et al., 2011), montrant une amélioration de différents paramètres inflammatoires (taux d'IL6 et de TNF α , activation des LT CD4) sans effet sur la charge virale VIH qui restait indétectable. Cependant, à 6 mois de traitement, le pourcentage de LT CD4 était augmenté de manière significative, mais pas le nombre absolu. Mais une étude récente a soulevé d'autres questions quant à la manière d'utiliser l'hydroxychloroquine chez les patients infectés. Paton et al (Paton et al., 2012) ont montré que l'utilisation de ce traitement chez des patients non traités par anti-

rétroviraux aboutissait à une augmentation de la CV VIH et une diminution des LT CD4, confortant l'idée que, chez des patients virémiques, les effets antiviraux de l'Interféron doivent être maintenus *a minima* et que la modulation de cette voie ne se conçoit pas sans ARV. L'utilisation de l'hydroxychloroquine comme immunomodulateur de l'activation immune excessive, chez des patients contrôlés virologiquement – dont les HICs à charge virale indétectable, nécessite d'être encore étudiée afin de trouver sa place dans l'arsenal thérapeutique.

Enfin, une autre classe intéressante pourrait être étudiée afin de moduler la production d'IP10 et l'inflammation chez les HICs. Les statines, traitements hypolipémiants ayant montré des effets réducteurs de l'inflammation vasculaire et systémique, sont en effet une arme potentielle importante. Ainsi, l'atorvastatine pourrait être bénéfique dans les modèles murins de neuropaludisme en diminuant l'inflammation cérébrale par la réduction d'IP10 et du recrutement lymphocytaire (Wilson et al., 2013) et la simvastatine réduit *in vitro* la production d'IP10 par les monocytes dans le contexte d'une exposition au Rhinovirus (Wickert et al., 2014). En pathologie humaine, l'atorvastatine et la fluvastatine permettent de réduire les taux d'IP10 circulants de patients suivis pour une maladie de Crohn (Grip and Janciauskiene, 2009) ou un syndrome des antiphospholipides (Erkan et al., 2014), respectivement. Dans le cadre de l'infection par le VIH, les statines sont utilisées en pratique courante dans le cadre de la réduction du risque cardiovasculaire. Au vu de leur profil de tolérance satisfaisant, leurs effets immunomodulateurs méritent d'être analysés à part chez les patients HIV controllers à risque de progression immunologique ou présentant des niveaux d'activation élevés.

CONCLUSION

Nos travaux ont permis d'analyser les paramètres d'inflammation chez les patients HIV controllers, en lien avec les données immunovirologiques, l'activation lymphocytaire T CD4 et T CD8 de ces patients, l'étude de la production de gènes induits par l'interféron et leur profil évolutif.

Dans le travail n°1, nous avons ainsi pu montrer que les patients HIV controllers présentaient des taux d'IP10, de TNF α et de CD14 soluble supérieurs à ceux des personnes non infectées, sans lien direct avec l'importance de la réplication virale ou la translocation microbienne digestive. Plus encore, nos résultats montrent que les taux circulants de la chimiokine IP10 sont intéressants dans le suivi de l'activation immunitaire des HICs, suggérant un lien avec deux autres paramètres d'intérêt physiopathologique : l'étude de la voie des interférons et de l'activation du compartiment monocyttaire.

Ainsi, notre étude de la production des gènes induits par l'interféron (travail n°2) suggère un rôle du gène *ifitm1* comme potentiel facteur de restriction induit par l'inflammation et les interférons, dont la caractérisation est importante. Enfin, nous avons analysé les causes possibles d'échappement immuno-virologique des HICs dans le travail n°3, suggérant une place pour IP10 dans l'arsenal de suivi des patients à risque de baisse des LT CD4.

La caractérisation de la régulation d'IP10, des ISGs et de l'activation du compartiment monocyttaire est en cours chez les HICs. Ces travaux servent de base à la réflexion de l'immunomodulation des patients HICs à risque d'échappement, afin notamment de trouver la place de molécules comme l'hydroxychloroquine ou les statines comme réducteurs de l'inflammation et de ses conséquences.

REFERENCES

- Abad-Fernández, M., Vallejo, A., Hernández-Novoa, B., Díaz, L., Gutiérrez, C., Madrid, N., Muñoz, M.A., and Moreno, S. (2013). Correlation between different methods to measure microbial translocation and its association with immune activation in long-term suppressed HIV-1-infected individuals. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 1999 64, 149–153.
- Abdel-Mohsen, M., Raposo, R.A.S., Deng, X., Li, M., Liegler, T., Sinclair, E., Salama, M.S., Ghanem, H.E.-D.A., Hoh, R., Wong, J.K., et al. (2013). Expression profile of host restriction factors in HIV-1 elite controllers. *Retrovirology* 10, 106.
- Abdel-Mohsen, M., Deng, X., Liegler, T., Guatelli, J.C., Salama, M.S., Ghanem, H.E.A., Rauch, A., Ledergerber, B., Deeks, S.G., Günthard, H.F., et al. (2014). Effects of alpha interferon treatment on intrinsic anti-HIV-1 immunity in vivo. *J. Virol.* 88, 763–767.
- Ackerman, M.E., Crispin, M., Yu, X., Baruah, K., Boesch, A.W., Harvey, D.J., Dugast, A.-S., Heizen, E.L., Ercan, A., Choi, I., et al. (2013). Natural variation in Fc glycosylation of HIV-specific antibodies impacts antiviral activity. *J. Clin. Invest.* 123, 2183–2192.
- Adalid-Peralta, L., Godot, V., Colin, C., Krzysiek, R., Tran, T., Poignard, P., Venet, A., Hosmalin, A., Lebon, P., Rouzioux, C., et al. (2008). Stimulation of the primary anti-HIV antibody response by IFN-alpha in patients with acute HIV-1 infection. *J. Leukoc. Biol.* 83, 1060–1067.
- Agostini, C., Facco, M., Siviero, M., Carollo, D., Galvan, S., Cattelan, A.M., Zambello, R., Trentin, L., and Semenzato, G. (2000). CXC chemokines IP-10 and mig expression and direct migration of pulmonary CD8+/CXCR3+ T cells in the lungs of patients with HIV infection and T-cell alveolitis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 162, 1466–1473.
- Akila, P., Prashant, V., Suma, M.N., Prashant, S.N., and Chaitra, T.R. (2012). CD163 and its expanding functional repertoire. *Clin. Chim. Acta Int. J. Clin. Chem.* 413, 669–674.
- Aksoy, M.O., Yang, Y., Ji, R., Reddy, P.J., Shahabuddin, S., Litvin, J., Rogers, T.J., and Kelsen, S.G. (2006). CXCR3 surface expression in human airway epithelial cells: cell cycle dependence and effect on cell proliferation. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 290, L909–L918.
- Alatrakchi, N., Di Martino, V., Thibault, V., Autran, B., and ALT and IMMUNE-VIRC ANRS study groups (2002). Strong CD4 Th1 responses to HIV and hepatitis C virus in HIV-infected long-term non-progressors co-infected with hepatitis C virus. *AIDS Lond. Engl.* 16, 713–717.
- Alter, G., Teigen, N., Davis, B.T., Addo, M.M., Suscovich, T.J., Waring, M.T., Streeck, H., Johnston, M.N., Staller, K.D., Zaman, M.T., et al. (2005). Sequential deregulation of NK cell subset distribution and function starting in acute HIV-1 infection. *Blood* 106, 3366–3369.
- Amu, S., Ruffin, N., Rethi, B., and Chiodi, F. (2013). Impairment of B-cell functions during HIV-1 infection. *AIDS Lond. Engl.* 27, 2323–2334.

Antiretroviral Therapy Cohort Collaboration (2010). Causes of death in HIV-1-infected patients treated with antiretroviral therapy, 1996-2006: collaborative analysis of 13 HIV cohort studies. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* *50*, 1387–1396.

Appay, V., and Sauce, D. (2008). Immune activation and inflammation in HIV-1 infection: causes and consequences. *J. Pathol.* *214*, 231–241.

Aukrust, P., Müller, F., Lien, E., Nordoy, I., Liabakk, N.B., Kvale, D., Espevik, T., and Froland, S.S. (1999). Tumor necrosis factor (TNF) system levels in human immunodeficiency virus-infected patients during highly active antiretroviral therapy: persistent TNF activation is associated with virologic and immunologic treatment failure. *J. Infect. Dis.* *179*, 74–82.

Azzoni, L., Foulkes, A.S., Papasavvas, E., Mexas, A.M., Lynn, K.M., Mounzer, K., Tebas, P., Jacobson, J.M., Frank, I., Busch, M.P., et al. (2013). Pegylated Interferon alfa-2a monotherapy results in suppression of HIV type 1 replication and decreased cell-associated HIV DNA integration. *J. Infect. Dis.* *207*, 213–222.

Bailey, J.R., Lassen, K.G., Yang, H.-C., Quinn, T.C., Ray, S.C., Blankson, J.N., and Siliciano, R.F. (2006). Neutralizing antibodies do not mediate suppression of human immunodeficiency virus type 1 in elite suppressors or selection of plasma virus variants in patients on highly active antiretroviral therapy. *J. Virol.* *80*, 4758–4770.

Bailey, J.R., Zhang, H., Wegweiser, B.W., Yang, H.-C., Herrera, L., Ahonkhai, A., Williams, T.M., Siliciano, R.F., and Blankson, J.N. (2007). Evolution of HIV-1 in an HLA-B*57-positive patient during virologic escape. *J. Infect. Dis.* *196*, 50–55.

Baker, J.V., and Duprez, D. (2010). Biomarkers and HIV-associated cardiovascular disease. *Curr. Opin. HIV AIDS* *5*, 511–516.

Baker, J., Ayenew, W., Quick, H., Hullsiek, K.H., Tracy, R., Henry, K., Duprez, D., and Neaton, J.D. (2010). High-density lipoprotein particles and markers of inflammation and thrombotic activity in patients with untreated HIV infection. *J. Infect. Dis.* *201*, 285–292.

Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y.J., Pulendran, B., and Palucka, K. (2000). Immunobiology of dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* *18*, 767–811.

Barblu, L., Machmach, K., Gras, C., Delfraissy, J.-F., Boufassa, F., Leal, M., Ruiz-Mateos, E., Lambotte, O., and Herbeuval, J.-P. (2012). Plasmacytoid dendritic cells (pDCs) from HIV controllers produce interferon- α and differentiate into functional killer pDCs under HIV activation. *J. Infect. Dis.* *206*, 790–801.

Barblu, L., Smith, N., Durand, S., Scott-Algara, D., Boufassa, F., Delfraissy, J.-F., Cimorelli, A., Lambotte, O., and Herbeuval, J.-P. (2014). Reduction of death receptor 5 expression and apoptosis of CD4⁺ T cells from HIV controllers. *Clin. Immunol. Orlando Fla* *155*, 17–26.

Barré-Sinoussi, F., Chermann, J.C., Rey, F., Nugeyre, M.T., Chamaret, S., Gruest, J., Dauguet, C., Axler-Blin, C., Vézinet-Brun, F., Rouzioux, C., et al. (1983). Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* *220*, 868–871.

Bastard, J.-P., Soulié, C., Fellahi, S., Haïm-Boukobza, S., Simon, A., Katlama, C., Calvez, V., Marcelin, A.-G., and Capeau, J. (2012). Circulating interleukin-6 levels correlate with residual HIV viraemia and markers of immune dysfunction in treatment-controlled HIV-infected patients. *Antivir. Ther.* 17, 915–919.

Beaumier, C.M., Harris, L.D., Goldstein, S., Klatt, N.R., Whitted, S., McGinty, J., Apetrei, C., Pandrea, I., Hirsch, V.M., and Brenchley, J.M. (2009). CD4 downregulation by memory CD4+ T cells in vivo renders African green monkeys resistant to progressive SIVagm infection. *Nat. Med.* 15, 879–885.

Bednarik, D.P., Mosca, J.D., Raj, N.B., and Pitha, P.M. (1989). Inhibition of human immunodeficiency virus (HIV) replication by HIV-trans-activated alpha 2-interferon. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86, 4958–4962.

Berenguer, J., Fernandez-Rodríguez, A., Jimenez-Sousa, M.A., Cosín, J., Zarate, P., Micheloud, D., López, J.C., Miralles, P., Catalán, P., and Resino, S. (2012). High plasma CXCL10 levels are associated with HCV-genotype 1, and higher insulin resistance, fibrosis, and HIV viral load in HIV/HCV coinfecting patients. *Cytokine* 57, 25–29.

Betts, M.R., Price, D.A., Brenchley, J.M., Loré, K., Guenaga, F.J., Smed-Sorensen, A., Ambrozak, D.R., Migueles, S.A., Connors, M., Roederer, M., et al. (2004). The functional profile of primary human antiviral CD8+ T cell effector activity is dictated by cognate peptide concentration. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 172, 6407–6417.

Betts, M.R., Nason, M.C., West, S.M., De Rosa, S.C., Migueles, S.A., Abraham, J., Lederman, M.M., Benito, J.M., Goepfert, P.A., Connors, M., et al. (2006). HIV nonprogressors preferentially maintain highly functional HIV-specific CD8+ T cells. *Blood* 107, 4781–4789.

Blankson, J.N., Bailey, J.R., Thayil, S., Yang, H.-C., Lassen, K., Lai, J., Gandhi, S.K., Siliciano, J.D., Williams, T.M., and Siliciano, R.F. (2007). Isolation and characterization of replication-competent human immunodeficiency virus type 1 from a subset of elite suppressors. *J. Virol.* 81, 2508–2518.

Boasso, A., Hardy, A.W., Landay, A.L., Martinson, J.L., Anderson, S.A., Dolan, M.J., Clerici, M., and Shearer, G.M. (2008). PDL-1 upregulation on monocytes and T cells by HIV via type I interferon: restricted expression of type I interferon receptor by CCR5-expressing leukocytes. *Clin. Immunol. Orlando Fla* 129, 132–144.

Boaz, M.J., Waters, A., Murad, S., Easterbrook, P.J., and Vyakarnam, A. (2002). Presence of HIV-1 Gag-specific IFN-gamma+IL-2+ and CD28+IL-2+ CD4 T cell responses is associated with nonprogression in HIV-1 infection. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 169, 6376–6385.

Borregaard, N. (2010). Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity* 33, 657–670.

Bosinger, S.E., Li, Q., Gordon, S.N., Klatt, N.R., Duan, L., Xu, L., Francella, N., Sidahmed, A., Smith, A.J., Cramer, E.M., et al. (2009). Global genomic analysis reveals rapid control of a robust innate response in SIV-infected sooty mangabeys. *J. Clin. Invest.* 119, 3556–3572.

- Bosinger, S.E., Sodora, D.L., and Silvestri, G. (2011). Generalized immune activation and innate immune responses in simian immunodeficiency virus infection. *Curr. Opin. HIV AIDS* 6, 411–418.
- Bosinger, S.E., Jacquelin, B., Benecke, A., Silvestri, G., and Müller-Trutwin, M. (2012). Systems biology of natural simian immunodeficiency virus infections. *Curr. Opin. HIV AIDS* 7, 71–78.
- Boufassa, F., Saez-Cirion, A., Lechenadec, J., Zucman, D., Avettand-Fenoel, V., Venet, A., Rouzioux, C., Delfraissy, J.-F., Lambotte, O., and Meyer, L. (2011). CD4 dynamics over a 15 year-period among HIV controllers enrolled in the ANRS French observatory. *PloS One* 6, e18726.
- Boufassa, F., Lechenadec, J., Meyer, L., Costagliola, D., Hunt, P.W., Pereyra, F., Deeks, S., Pancino, G., Taulera, O., Lichterfeld, M., et al. (2014). Blunted Response to Combination Antiretroviral Therapy in HIV Elite Controllers: An International HIV Controller Collaboration. *PloS One* 9, e85516.
- Boulware, D.R., Hullsiek, K.H., Puronen, C.E., Rupert, A., Baker, J.V., French, M.A., Bohjanen, P.R., Novak, R.M., Neaton, J.D., and Sereti, I. (2011). Higher levels of CRP, D-dimer, IL-6, and hyaluronic acid before initiation of antiretroviral therapy (ART) are associated with increased risk of AIDS or death. *J. Infect. Dis.* 203, 1637–1646.
- Van Braeckel, E., Desombere, I., Clement, F., Vandekerckhove, L., Verhofstede, C., Vogelaers, D., and Leroux-Roels, G. (2013). Polyfunctional CD4(+) T cell responses in HIV-1-infected viral controllers compared with those in healthy recipients of an adjuvanted polyprotein HIV-1 vaccine. *Vaccine* 31, 3739–3746.
- Braibant, M., Brunet, S., Costagliola, D., Rouzioux, C., Agut, H., Katinger, H., Autran, B., and Barin, F. (2006). Antibodies to conserved epitopes of the HIV-1 envelope in sera from long-term non-progressors: prevalence and association with neutralizing activity. *AIDS Lond. Engl.* 20, 1923–1930.
- Brainard, D.M., Tager, A.M., Misdraji, J., Frahm, N., Lichterfeld, M., Draenert, R., Brander, C., Walker, B.D., and Luster, A.D. (2007). Decreased CXCR3+ CD8 T cells in advanced human immunodeficiency virus infection suggest that a homing defect contributes to cytotoxic T-lymphocyte dysfunction. *J. Virol.* 81, 8439–8450.
- Brenchley, J.M., Karandikar, N.J., Betts, M.R., Ambrozak, D.R., Hill, B.J., Crotty, L.E., Casazza, J.P., Kuruppu, J., Migueles, S.A., Connors, M., et al. (2003). Expression of CD57 defines replicative senescence and antigen-induced apoptotic death of CD8+ T cells. *Blood* 101, 2711–2720.
- Brenchley, J.M., Schacker, T.W., Ruff, L.E., Price, D.A., Taylor, J.H., Beilman, G.J., Nguyen, P.L., Khoruts, A., Larson, M., Haase, A.T., et al. (2004). CD4+ T cell depletion during all stages of HIV disease occurs predominantly in the gastrointestinal tract. *J. Exp. Med.* 200, 749–759.
- Brenchley, J.M., Price, D.A., Schacker, T.W., Asher, T.E., Silvestri, G., Rao, S., Kazzaz, Z., Bornstein, E., Lambotte, O., Altmann, D., et al. (2006). Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Nat. Med.* 12, 1365–1371.

Buckheit, R.W., Siliciano, R.F., and Blankson, J.N. (2013). Primary CD8+ T cells from elite suppressors effectively eliminate non-productively HIV-1 infected resting and activated CD4+ T cells. *Retrovirology* 10, 68.

Buggert, M., Tauriainen, J., Yamamoto, T., Frederiksen, J., Ivarsson, M.A., Michaëlsson, J., Lund, O., Hejdeman, B., Jansson, M., Sönnernborg, A., et al. (2014). T-bet and Eomes are differentially linked to the exhausted phenotype of CD8+ T cells in HIV infection. *PLoS Pathog.* 10, e1004251.

Burdo, T.H., Lentz, M.R., Autissier, P., Krishnan, A., Halpern, E., Letendre, S., Rosenberg, E.S., Ellis, R.J., and Williams, K.C. (2011a). Soluble CD163 made by monocyte/macrophages is a novel marker of HIV activity in early and chronic infection prior to and after anti-retroviral therapy. *J. Infect. Dis.* 204, 154–163.

Burdo, T.H., Lo, J., Abbara, S., Wei, J., DeLelys, M.E., Pfeffer, F., Rosenberg, E.S., Williams, K.C., and Grinspoon, S. (2011b). Soluble CD163, a novel marker of activated macrophages, is elevated and associated with noncalcified coronary plaque in HIV-infected patients. *J. Infect. Dis.* 204, 1227–1236.

Burdo, T.H., Lackner, A., and Williams, K.C. (2013a). Monocyte/macrophages and their role in HIV neuropathogenesis. *Immunol. Rev.* 254, 102–113.

Burdo, T.H., Weiffenbach, A., Woods, S.P., Letendre, S., Ellis, R.J., and Williams, K.C. (2013b). Elevated sCD163 in plasma but not cerebrospinal fluid is a marker of neurocognitive impairment in HIV infection. *AIDS Lond. Engl.* 27, 1387–1395.

Cagigi, A., Mowafi, F., Phuong Dang, L.V., Tenner-Racz, K., Atlas, A., Grutzmeier, S., Racz, P., Chiodi, F., and Nilsson, A. (2008). Altered expression of the receptor-ligand pair CXCR5/CXCL13 in B cells during chronic HIV-1 infection. *Blood* 112, 4401–4410.

Caligiuri, M.A., Zmuidzinas, A., Manley, T.J., Levine, H., Smith, K.A., and Ritz, J. (1990). Functional consequences of interleukin 2 receptor expression on resting human lymphocytes. Identification of a novel natural killer cell subset with high affinity receptors. *J. Exp. Med.* 171, 1509–1526.

Campbell, J.H., Hearps, A.C., Martin, G.E., Williams, K.C., and Crowe, S.M. (2014). The importance of monocytes and macrophages in HIV pathogenesis, treatment, and cure. *AIDS Lond. Engl.*

Campillo-Gimenez, L., Casulli, S., Dudoit, Y., Seang, S., Carcelain, G., Lambert-Niclot, S., Appay, V., Autran, B., Tubiana, R., and Elbim, C. (2014). Neutrophils in antiretroviral therapy-controlled HIV demonstrate hyperactivation associated with a specific IL-17/IL-22 environment. *J. Allergy Clin. Immunol.*

Cao, W., Jamieson, B.D., Hultin, L.E., Hultin, P.M., and Detels, R. (2009). Regulatory T cell expansion and immune activation during untreated HIV type 1 infection are associated with disease progression. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 25, 183–191.

Cao, Y., Qin, L., Zhang, L., Safrit, J., and Ho, D.D. (1995). Virologic and immunologic characterization of long-term survivors of human immunodeficiency virus type 1 infection. *N. Engl. J. Med.* 332, 201–208.

- Carabasi, M.H., DiSanto, J.P., Yang, S.Y., and Dupont, B. (1991). Activation of peripheral CD8+ T lymphocytes via CD28 plus CD2: evidence for IL-2 gene transcription mediated by CD28 activation. *Tissue Antigens* 37, 26–32.
- Card, C.M., Keynan, Y., Lajoie, J., Bell, C.P., Dawood, M., Becker, M., Kasper, K., and Fowke, K.R. (2012). HIV controllers are distinguished by chemokine expression profile and HIV-specific T-cell proliferative potential. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 1999 59, 427–437.
- Carotenuto, P., Looij, D., Keldermans, L., de Wolf, F., and Goudsmit, J. (1998). Neutralizing antibodies are positively associated with CD4+ T-cell counts and T-cell function in long-term AIDS-free infection. *AIDS Lond. Engl.* 12, 1591–1600.
- Casrouge, A., Decalf, J., Ahloulay, M., Lababidi, C., Mansour, H., Vallet-Pichard, A., Mallet, V., Mottez, E., Mapes, J., Fontanet, A., et al. (2011). Evidence for an antagonist form of the chemokine CXCL10 in patients chronically infected with HCV. *J. Clin. Invest.* 121, 308–317.
- Catalfamo, M., Wilhelm, C., Tcheung, L., Proschan, M., Friesen, T., Park, J.-H., Adelsberger, J., Baseler, M., Maldarelli, F., Davey, R., et al. (2011). CD4 and CD8 T cell immune activation during chronic HIV infection: roles of homeostasis, HIV, type I IFN, and IL-7. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 186, 2106–2116.
- Chang, J.J., Woods, M., Lindsay, R.J., Doyle, E.H., Griesbeck, M., Chan, E.S., Robbins, G.K., Bosch, R.J., and Altfeld, M. (2013). Higher expression of several interferon-stimulated genes in HIV-1-infected females after adjusting for the level of viral replication. *J. Infect. Dis.* 208, 830–838.
- Chen, H., Li, C., Huang, J., Cung, T., Seiss, K., Beamon, J., Carrington, M.F., Porter, L.C., Burke, P.S., Yang, Y., et al. (2011). CD4+ T cells from elite controllers resist HIV-1 infection by selective upregulation of p21. *J. Clin. Invest.* 121, 1549–1560.
- Chevalier, M.F., Petitjean, G., Dunyach-Rémy, C., Didier, C., Girard, P.-M., Manea, M.E., Campa, P., Meyer, L., Rouzioux, C., Lavigne, J.-P., et al. (2013). The Th17/Treg ratio, IL-1RA and sCD14 levels in primary HIV infection predict the T-cell activation set point in the absence of systemic microbial translocation. *PLoS Pathog.* 9, e1003453.
- Chutiwitoonchai, N., Hiyoshi, M., Hiyoshi-Yoshidomi, Y., Hashimoto, M., Tokunaga, K., and Suzu, S. (2013). Characteristics of IFITM, the newly identified IFN-inducible anti-HIV-1 family proteins. *Microbes Infect. Inst. Pasteur.*
- Clark-Lewis, I., Mattioli, I., Gong, J.-H., and Loetscher, P. (2003). Structure-function relationship between the human chemokine receptor CXCR3 and its ligands. *J. Biol. Chem.* 278, 289–295.
- Clerc, O., Colombo, S., Yerly, S., Telenti, A., and Cavassini, M. (2010). HIV-1 elite controllers: beware of super-infections. *J. Clin. Virol. Off. Publ. Pan Am. Soc. Clin. Virol.* 47, 376–378.
- Clerzius, G., Gélinas, J.-F., and Gatignol, A. (2011). Multiple levels of PKR inhibition during HIV-1 replication. *Rev. Med. Virol.* 21, 42–53.

- Colin, L., and Van Lint, C. (2009). Molecular control of HIV-1 postintegration latency: implications for the development of new therapeutic strategies. *Retrovirology* 6, 111.
- Cooper, M.A., Fehniger, T.A., Turner, S.C., Chen, K.S., Ghaheri, B.A., Ghayur, T., Carson, W.E., and Caligiuri, M.A. (2001). Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56(bright) subset. *Blood* 97, 3146–3151.
- Cossarizza, A., Ortolani, C., Mussini, C., Borghi, V., Guaraldi, G., Mongiardo, N., Bellesia, E., Franceschini, M.G., De Rienzo, B., and Franceschi, C. (1995). Massive activation of immune cells with an intact T cell repertoire in acute human immunodeficiency virus syndrome. *J. Infect. Dis.* 172, 105–112.
- Cozzi-Lepri, A., French, M.A., Baxter, J., Okhuysen, P., Plana, M., Neuhaus, J., and Landay, A. (2011). Resumption of HIV replication is associated with monocyte/macrophage derived cytokine and chemokine changes: results from a large international clinical trial. *AIDS Lond. Engl.* 25, 1207–1217.
- Dalmasso, C., Carpentier, W., Meyer, L., Rouzioux, C., Goujard, C., Chaix, M.-L., Lambotte, O., Avettand-Fenoel, V., Le Clerc, S., de Senneville, L.D., et al. (2008). Distinct genetic loci control plasma HIV-RNA and cellular HIV-DNA levels in HIV-1 infection: the ANRS Genome Wide Association 01 study. *PloS One* 3, e3907.
- Day, C.L., Kaufmann, D.E., Kiepiela, P., Brown, J.A., Moodley, E.S., Reddy, S., Mackey, E.W., Miller, J.D., Leslie, A.J., DePierres, C., et al. (2006). PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression. *Nature* 443, 350–354.
- Deeks, S.G., and Walker, B.D. (2007). Human immunodeficiency virus controllers: mechanisms of durable virus control in the absence of antiretroviral therapy. *Immunity* 27, 406–416.
- Deeks, S.G., Kitchen, C.M.R., Liu, L., Guo, H., Gascon, R., Narváez, A.B., Hunt, P., Martin, J.N., Kahn, J.O., Levy, J., et al. (2004). Immune activation set point during early HIV infection predicts subsequent CD4+ T-cell changes independent of viral load. *Blood* 104, 942–947.
- Deeks, S.G., Schweighardt, B., Wrin, T., Galovich, J., Hoh, R., Sinclair, E., Hunt, P., McCune, J.M., Martin, J.N., Petropoulos, C.J., et al. (2006). Neutralizing antibody responses against autologous and heterologous viruses in acute versus chronic human immunodeficiency virus (HIV) infection: evidence for a constraint on the ability of HIV to completely evade neutralizing antibody responses. *J. Virol.* 80, 6155–6164.
- Demoustier, A., Gubler, B., Lambotte, O., de Goër, M.-G., Wallon, C., Goujard, C., Delfraissy, J.-F., and Taoufik, Y. (2002). In patients on prolonged HAART, a significant pool of HIV infected CD4 T cells are HIV-specific. *AIDS Lond. Engl.* 16, 1749–1754.
- Diamond, M.S., and Farzan, M. (2013). The broad-spectrum antiviral functions of IFIT and IFITM proteins. *Nat. Rev. Immunol.* 13, 46–57.
- Ding, S., Pan, Q., Liu, S.-L., and Liang, C. (2014). HIV-1 mutates to evade IFITM1 restriction. *Virology* 454-455, 11–24.

- Dion, M.-L., Poulin, J.-F., Bordi, R., Sylvestre, M., Corsini, R., Kettaf, N., Dalloul, A., Boulassel, M.-R., Debré, P., Routy, J.-P., et al. (2004). HIV infection rapidly induces and maintains a substantial suppression of thymocyte proliferation. *Immunity* 21, 757–768.
- Doria-Rose, N.A., Klein, R.M., Daniels, M.G., O'Dell, S., Nason, M., Lapedes, A., Bhattacharya, T., Migueles, S.A., Wyatt, R.T., Korber, B.T., et al. (2010). Breadth of human immunodeficiency virus-specific neutralizing activity in sera: clustering analysis and association with clinical variables. *J. Virol.* 84, 1631–1636.
- Douek, D.C., McFarland, R.D., Keiser, P.H., Gage, E.A., Massey, J.M., Haynes, B.F., Polis, M.A., Haase, A.T., Feinberg, M.B., Sullivan, J.L., et al. (1998). Changes in thymic function with age and during the treatment of HIV infection. *Nature* 396, 690–695.
- Douek, D.C., Brenchley, J.M., Betts, M.R., Ambrozak, D.R., Hill, B.J., Okamoto, Y., Casazza, J.P., Kuruppu, J., Kunstman, K., Wolinsky, S., et al. (2002). HIV preferentially infects HIV-specific CD4⁺ T cells. *Nature* 417, 95–98.
- Dutertre, C.-A., Amraoui, S., DeRosa, A., Jourdain, J.-P., Vimeux, L., Goguet, M., Degrelle, S., Feuillet, V., Liovat, A.-S., Müller-Trutwin, M., et al. (2012). Pivotal role of M-DC8⁺ monocytes from viremic HIV-infected patients in TNF α overproduction in response to microbial products. *Blood* 120, 2259–2268.
- Dyer, W.B., Zaunders, J.J., Yuan, F.F., Wang, B., Learmont, J.C., Geczy, A.F., Saksena, N.K., McPhee, D.A., Gorry, P.R., and Sullivan, J.S. (2008). Mechanisms of HIV non-progression; robust and sustained CD4⁺ T-cell proliferative responses to p24 antigen correlate with control of viraemia and lack of disease progression after long-term transfusion-acquired HIV-1 infection. *Retrovirology* 5, 112.
- Eastburn, A., Scherzer, R., Zolopa, A.R., Benson, C., Tracy, R., Do, T., Bacchetti, P., Shlipak, M., Grunfeld, C., and Tien, P.C. (2011). Association of low level viremia with inflammation and mortality in HIV-infected adults. *PloS One* 6, e26320.
- Elbim, C., Prevot, M.H., Bouscarat, F., Franzini, E., Chollet-Martin, S., Hakim, J., and Gougerot-Pocidalo, M.A. (1994). Polymorphonuclear neutrophils from human immunodeficiency virus-infected patients show enhanced activation, diminished fMLP-induced L-selectin shedding, and an impaired oxidative burst after cytokine priming. *Blood* 84, 2759–2766.
- Elrefaei, M., McElroy, M.D., Preas, C.P., Hoh, R., Deeks, S., Martin, J., and Cao, H. (2004). Central memory CD4⁺ T cell responses in chronic HIV infection are not restored by antiretroviral therapy. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 173, 2184–2189.
- El-Sadr, W.M., Lundgren, J.D., Neaton, J.D., Gordin, F., Abrams, D., Arduino, R.C., Babiker, A., Burman, W., Clumeck, N., Cohen, C.J., et al. (2006). CD4⁺ count-guided interruption of antiretroviral treatment. *N. Engl. J. Med.* 355, 2283–2296.
- Emu, B., Sinclair, E., Favre, D., Moretto, W.J., Hsue, P., Hoh, R., Martin, J.N., Nixon, D.F., McCune, J.M., and Deeks, S.G. (2005). Phenotypic, functional, and kinetic parameters associated with apparent T-cell control of human immunodeficiency virus replication in individuals with and without antiretroviral treatment. *J. Virol.* 79, 14169–14178.

- Emu, B., Sinclair, E., Hatano, H., Ferre, A., Shacklett, B., Martin, J.N., McCune, J.M., and Deeks, S.G. (2008). HLA class I-restricted T-cell responses may contribute to the control of human immunodeficiency virus infection, but such responses are not always necessary for long-term virus control. *J. Virol.* 82, 5398–5407.
- Erkan, D., Willis, R., Murthy, V.L., Basra, G., Vega, J., Ruiz-Limón, P., Carrera, A.L., Papalardo, E., Martínez-Martínez, L.A., González, E.B., et al. (2014). A prospective open-label pilot study of fluvastatin on proinflammatory and prothrombotic biomarkers in antiphospholipid antibody positive patients. *Ann. Rheum. Dis.* 73, 1176–1180.
- Escoté, X., Megia, A., López-Dupla, M., Miranda, M., Veloso, S., Alba, V., Domingo, P., Pardo, P., Viladés, C., Peraire, J., et al. (2011). A study of fatty acid binding protein 4 in HIV-1 infection and in combination antiretroviral therapy-related metabolic disturbances and lipodystrophy. *HIV Med.* 12, 428–437.
- Estes, J.D., Wietgreffe, S., Schacker, T., Southern, P., Beilman, G., Reilly, C., Milush, J.M., Lifson, J.D., Sodora, D.L., Carlis, J.V., et al. (2007). Simian immunodeficiency virus-induced lymphatic tissue fibrosis is mediated by transforming growth factor beta 1-positive regulatory T cells and begins in early infection. *J. Infect. Dis.* 195, 551–561.
- Fauci, A.S., Mavilio, D., and Kottlil, S. (2005). NK cells in HIV infection: paradigm for protection or targets for ambush. *Nat. Rev. Immunol.* 5, 835–843.
- Favre, D., Lederer, S., Kanwar, B., Ma, Z.-M., Proll, S., Kasakow, Z., Mold, J., Swainson, L., Barbour, J.D., Baskin, C.R., et al. (2009). Critical loss of the balance between Th17 and T regulatory cell populations in pathogenic SIV infection. *PLoS Pathog.* 5, e1000295.
- Fellay, J., Shianna, K.V., Ge, D., Colombo, S., Ledergerber, B., Weale, M., Zhang, K., Gumbs, C., Castagna, A., Cossarizza, A., et al. (2007). A whole-genome association study of major determinants for host control of HIV-1. *Science* 317, 944–947.
- Fernandez, S., Tanaskovic, S., Helbig, K., Rajasuriar, R., Kramski, M., Murray, J.M., Beard, M., Purcell, D., Lewin, S.R., Price, P., et al. (2011). CD4+ T-cell deficiency in HIV patients responding to antiretroviral therapy is associated with increased expression of interferon-stimulated genes in CD4+ T cells. *J. Infect. Dis.* 204, 1927–1935.
- Fernández-Cruz, E., Lang, J.M., Frissen, J., Furner, V., Châteauvert, M., Boucher, C.A., Dowd, P., and Stevens, J. (1995). Zidovudine plus interferon-alpha versus zidovudine alone in HIV-infected symptomatic or asymptomatic persons with CD4+ cell counts > 150 x 10⁶/L: results of the Zidon trial. Zidon Study Group. *AIDS Lond. Engl.* 9, 1025–1035.
- Ferre, A.L., Hunt, P.W., Critchfield, J.W., Young, D.H., Morris, M.M., Garcia, J.C., Pollard, R.B., Yee, H.F., Jr, Martin, J.N., Deeks, S.G., et al. (2009). Mucosal immune responses to HIV-1 in elite controllers: a potential correlate of immune control. *Blood* 113, 3978–3989.
- Fonteneau, J.-F., Larsson, M., Beignon, A.-S., McKenna, K., Dasilva, I., Amara, A., Liu, Y.-J., Lifson, J.D., Littman, D.R., and Bhardwaj, N. (2004). Human immunodeficiency virus type 1 activates plasmacytoid dendritic cells and concomitantly induces the bystander maturation of myeloid dendritic cells. *J. Virol.* 78, 5223–5232.

- French, M.A., King, M.S., Tschampa, J.M., da Silva, B.A., and Landay, A.L. (2009). Serum immune activation markers are persistently increased in patients with HIV infection after 6 years of antiretroviral therapy despite suppression of viral replication and reconstitution of CD4+ T cells. *J. Infect. Dis.* *200*, 1212–1215.
- Gabelloni, M.L., Trevani, A.S., Sabatté, J., and Geffner, J. (2013). Mechanisms regulating neutrophil survival and cell death. *Semin. Immunopathol.* *35*, 423–437.
- Gasser, S., and Raulet, D.H. (2006). Activation and self-tolerance of natural killer cells. *Immunol. Rev.* *214*, 130–142.
- Gauvin, T., Ribeiro, R.M., Gautam, R., Dufour, J., Mandell, D., Apetrei, C., and Pandrea, I. (2010). Experimental depletion of CD8+ cells in acutely SIVagm-infected African Green Monkeys results in increased viral replication. *Retrovirology* *7*, 42.
- Gea-Banacloche, J.C., Migueles, S.A., Martino, L., Shupert, W.L., McNeil, A.C., Sabbaghian, M.S., Ehler, L., Prussin, C., Stevens, R., Lambert, L., et al. (2000). Maintenance of large numbers of virus-specific CD8+ T cells in HIV-infected progressors and long-term nonprogressors. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *165*, 1082–1092.
- Giorgi, J.V., Hultin, L.E., McKeating, J.A., Johnson, T.D., Owens, B., Jacobson, L.P., Shih, R., Lewis, J., Wiley, D.J., Phair, J.P., et al. (1999). Shorter survival in advanced human immunodeficiency virus type 1 infection is more closely associated with T lymphocyte activation than with plasma virus burden or virus chemokine coreceptor usage. *J. Infect. Dis.* *179*, 859–870.
- Gottenberg, J.-E., Cagnard, N., Lucchesi, C., Letourneur, F., Mistou, S., Lazure, T., Jacques, S., Ba, N., Ittah, M., Lepajolec, C., et al. (2006). Activation of IFN pathways and plasmacytoid dendritic cell recruitment in target organs of primary Sjögren's syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 2770–2775.
- Goujard, C., Emilie, D., Roussillon, C., Godot, V., Rouzioux, C., Venet, A., Colin, C., Pialoux, G., Girard, P.-M., Boilet, V., et al. (2012). Continuous versus intermittent treatment strategies during primary HIV-1 infection: the randomized ANRS INTERPRIM Trial. *AIDS Lond. Engl.* *26*, 1895–1905.
- Goujon, C., Moncorgé, O., Bauby, H., Doyle, T., Ward, C.C., Schaller, T., Hué, S., Barclay, W.S., Schulz, R., and Malim, M.H. (2013). Human MX2 is an interferon-induced post-entry inhibitor of HIV-1 infection. *Nature* *502*, 559–562.
- Grabar, S., Selinger-Leneman, H., Abgrall, S., Pialoux, G., Weiss, L., and Costagliola, D. (2009). Prevalence and comparative characteristics of long-term nonprogressors and HIV controller patients in the French Hospital Database on HIV. *AIDS Lond. Engl.* *23*, 1163–1169.
- Granier, C., Battivelli, E., Lécuroux, C., Venet, A., Lambotte, O., Schmitt-Boulanger, M., Delaugerre, C., Molina, J.-M., Chakrabarti, L.A., Clavel, F., et al. (2013). Pressure from TRIM5α contributes to control of HIV-1 replication by individuals expressing protective HLA-B alleles. *J. Virol.* *87*, 10368–10380.

Van Grevenynghe, J., Cubas, R.A., Noto, A., DaFonseca, S., He, Z., Peretz, Y., Filali-Mouhim, A., Dupuy, F.P., Procopio, F.A., Chomont, N., et al. (2011). Loss of memory B cells during chronic HIV infection is driven by Foxo3a- and TRAIL-mediated apoptosis. *J. Clin. Invest.* *121*, 3877–3888.

Grip, O., and Janciauskiene, S. (2009). Atorvastatin reduces plasma levels of chemokine (CXCL10) in patients with Crohn's disease. *PloS One* *4*, e5263.

Groves, K.C., Bibby, D.F., Clark, D.A., Isaksen, A., Deayton, J.R., Anderson, J., Orkin, C., Stagg, A.J., and McKnight, A. (2012). Disease Progression in HIV-1-Infected Viremic Controllers. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* *1999* *61*, 407–416.

Guo, H., Gao, J., Taxman, D.J., Ting, J.P.Y., and Su, L. (2014). HIV-1 Infection Induces Interleukin-1 β Production via TLR8 Protein-dependent and NLRP3 Inflammasome Mechanisms in Human Monocytes. *J. Biol. Chem.* *289*, 21716–21726.

Gurdasani, D., Iles, L., Dillon, D.G., Young, E.H., Olson, A.D., Naranbhai, V., Fidler, S., Gkrania-Klotsas, E., Post, F.A., Kellam, P., et al. (2014). A systematic review of definitions of extreme phenotypes of HIV control and progression. *AIDS Lond. Engl.* *28*, 149–162.

Guzmán-Fulgencio, M., Medrano, J., Rallón, N., Echeverria-Urabayen, A., Miguel Benito, J., Restrepo, C., García-Álvarez, M., Vispo, E., San Roman, J., Sánchez-Piedra, C., et al. (2011). Soluble markers of inflammation are associated with Framingham scores in HIV-infected patients on suppressive antiretroviral therapy. *J. Infect.* *63*, 382–390.

Haase, A.T. (2005). Perils at mucosal front lines for HIV and SIV and their hosts. *Nat. Rev. Immunol.* *5*, 783–792.

Haller, O., and Kochs, G. (2011). Human MxA protein: an interferon-induced dynamin-like GTPase with broad antiviral activity. *J. Interferon Cytokine Res. Off. J. Int. Soc. Interferon Cytokine Res.* *31*, 79–87.

Harari, A., Vallelian, F., Meylan, P.R., and Pantaleo, G. (2005). Functional heterogeneity of memory CD4 T cell responses in different conditions of antigen exposure and persistence. *J. Immunol. Baltim. Md* *1950* *174*, 1037–1045.

Hardy, G.A.D., Sieg, S.F., Rodriguez, B., Jiang, W., Asaad, R., Lederman, M.M., and Harding, C.V. (2009). Desensitization to type I interferon in HIV-1 infection correlates with markers of immune activation and disease progression. *Blood* *113*, 5497–5505.

Hardy, G.A.D., Sieg, S., Rodriguez, B., Anthony, D., Asaad, R., Jiang, W., Mudd, J., Schacker, T., Funderburg, N.T., Pilch-Cooper, H.A., et al. (2013). Interferon- α is the primary plasma type-I IFN in HIV-1 infection and correlates with immune activation and disease markers. *PloS One* *8*, e56527.

Harman, A.N., Lai, J., Turville, S., Samarajiwa, S., Gray, L., Marsden, V., Mercier, S.K., Mercier, S., Jones, K., Nasr, N., et al. (2011). HIV infection of dendritic cells subverts the IFN induction pathway via IRF-1 and inhibits type 1 IFN production. *Blood* *118*, 298–308.

Harris, L.D., Tabb, B., Sodora, D.L., Paiardini, M., Klatt, N.R., Douek, D.C., Silvestri, G., Müller-Trutwin, M., Vasile-Pandrea, I., Apetrei, C., et al. (2010). Downregulation of robust acute type I interferon responses distinguishes nonpathogenic simian immunodeficiency virus (SIV) infection of natural hosts from pathogenic SIV infection of rhesus macaques. *J. Virol.* *84*, 7886–7891.

Hatano, H., Delwart, E.L., Norris, P.J., Lee, T.-H., Dunn-Williams, J., Hunt, P.W., Hoh, R., Stramer, S.L., Linnen, J.M., McCune, J.M., et al. (2009). Evidence for persistent low-level viremia in individuals who control human immunodeficiency virus in the absence of antiretroviral therapy. *J. Virol.* *83*, 329–335.

Hatano, H., Delwart, E.L., Norris, P.J., Lee, T.-H., Neilands, T.B., Kelley, C.F., Hunt, P.W., Hoh, R., Linnen, J.M., Martin, J.N., et al. (2010). Evidence of persistent low-level viremia in long-term HAART-suppressed, HIV-infected individuals. *AIDS Lond. Engl.* *24*, 2535–2539.

Hatano, H., Jain, V., Hunt, P.W., Lee, T.-H., Sinclair, E., Do, T.D., Hoh, R., Martin, J.N., McCune, J.M., Hecht, F., et al. (2013a). Cell-based measures of viral persistence are associated with immune activation and programmed cell death protein 1 (PD-1)-expressing CD4⁺ T cells. *J. Infect. Dis.* *208*, 50–56.

Hatano, H., Somsouk, M., Sinclair, E., Harvill, K., Gilman, L., Cohen, M., Hoh, R., Hunt, P.W., Martin, J.N., Wong, J.K., et al. (2013b). Comparison of HIV DNA and RNA in gut-associated lymphoid tissue of HIV-infected controllers and noncontrollers. *AIDS Lond. Engl.* *27*, 2255–2260.

Hatano, H., Yukl, S.A., Ferre, A.L., Graf, E.H., Somsouk, M., Sinclair, E., Abdel-Mohsen, M., Liegler, T., Harvill, K., Hoh, R., et al. (2013c). Prospective antiretroviral treatment of asymptomatic, HIV-1 infected controllers. *PLoS Pathog.* *9*, e1003691.

Haynes, B.F. (2006). Gut microbes out of control in HIV infection. *Nat. Med.* *12*, 1351–1352.

Heidenreich, F., Arendt, G., Jander, S., Jablonowski, H., and Stoll, G. (1994). Serum and cerebrospinal fluid levels of soluble intercellular adhesion molecule 1 (sICAM-1) in patients with HIV-1 associated neurological diseases. *J. Neuroimmunol.* *52*, 117–126.

Herbeuval, J.-P., and Shearer, G.M. (2007). HIV-1 immunopathogenesis: how good interferon turns bad. *Clin. Immunol. Orlando Fla* *123*, 121–128.

Herbeuval, J.-P., Hardy, A.W., Boasso, A., Anderson, S.A., Dolan, M.J., Dy, M., and Shearer, G.M. (2005a). Regulation of TNF-related apoptosis-inducing ligand on primary CD4⁺ T cells by HIV-1: role of type I IFN-producing plasmacytoid dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 13974–13979.

Herbeuval, J.-P., Grivel, J.-C., Boasso, A., Hardy, A.W., Chougnet, C., Dolan, M.J., Yagita, H., Lifson, J.D., and Shearer, G.M. (2005b). CD4⁺ T-cell death induced by infectious and noninfectious HIV-1: role of type 1 interferon-dependent, TRAIL/DR5-mediated apoptosis. *Blood* *106*, 3524–3531.

- Herbeuval, J.-P., Boasso, A., Grivel, J.-C., Hardy, A.W., Anderson, S.A., Dolan, M.J., Chougnnet, C., Lifson, J.D., and Shearer, G.M. (2005c). TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) in HIV-1-infected patients and its in vitro production by antigen-presenting cells. *Blood* 105, 2458–2464.
- Hersperger, A.R., Pereyra, F., Nason, M., Demers, K., Sheth, P., Shin, L.Y., Kovacs, C.M., Rodriguez, B., Sieg, S.F., Teixeira-Johnson, L., et al. (2010). Perforin expression directly ex vivo by HIV-specific CD8 T-cells is a correlate of HIV elite control. *PLoS Pathog.* 6, e1000917.
- Hirata, S., Dirven, L., Shen, Y., Centola, M., Cavet, G., Lems, W.F., Tanaka, Y., Huizinga, T.W.J., and Allaart, C.F. (2013). A multi-biomarker score measures rheumatoid arthritis disease activity in the BeSt study. *Rheumatol. Oxf. Engl.* 52, 1202–1207.
- Hirsch, V.M., Olmsted, R.A., Murphey-Corb, M., Purcell, R.H., and Johnson, P.R. (1989). An African primate lentivirus (SIVsm) closely related to HIV-2. *Nature* 339, 389–392.
- Hladik, F., and McElrath, M.J. (2008). Setting the stage: host invasion by HIV. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 447–457.
- Hoen, B., Bonnet, F., Delaugerre, C., Delobel, P., Goujard, C., L'Hénaff, M., Persiaux, R., Rey, D., Rouzioux, C., Taburet, A.-M., et al. (2014). French 2013 guidelines for antiretroviral therapy of HIV-1 infection in adults. *J. Int. AIDS Soc.* 17, 19034.
- Honda, K., and Taniguchi, T. (2006). IRFs: master regulators of signalling by Toll-like receptors and cytosolic pattern-recognition receptors. *Nat. Rev. Immunol.* 6, 644–658.
- Hoshino, S., Konishi, M., Mori, M., Shimura, M., Nishitani, C., Kuroki, Y., Koyanagi, Y., Kano, S., Itabe, H., and Ishizaka, Y. (2010). HIV-1 Vpr induces TLR4/MyD88-mediated IL-6 production and reactivates viral production from latency. *J. Leukoc. Biol.* 87, 1133–1143.
- Hosmalin, A., Samri, A., Dumaourier, M.J., Dudoit, Y., Oksenhendler, E., Karmochkine, M., Autran, B., Wain-Hobson, S., and Cheynier, R. (2001). HIV-specific effector cytotoxic T lymphocytes and HIV-producing cells colocalize in white pulps and germinal centers from infected patients. *Blood* 97, 2695–2701.
- Hsue, P.Y., Hunt, P.W., Schnell, A., Kalapus, S.C., Hoh, R., Ganz, P., Martin, J.N., and Deeks, S.G. (2009). Role of viral replication, antiretroviral therapy, and immunodeficiency in HIV-associated atherosclerosis. *AIDS Lond. Engl.* 23, 1059–1067.
- Hua, S., Lécroux, C., Sáez-Ciri3n, A., Pancino, G., Girault, I., Versmisse, P., Boufassa, F., Taulera, O., Sinet, M., Lambotte, O., et al. (2014). Potential role for HIV-specific CD38-/HLA-DR+ CD8+ T cells in viral suppression and cytotoxicity in HIV controllers. *PloS One* 9, e101920.
- Huang, J., Yang, Y., Al-Mozaini, M., Burke, P.S., Beamon, J., Carrington, M.F., Seiss, K., Rychert, J., Rosenberg, E.S., Lichterfeld, M., et al. (2011). Dendritic cell dysfunction during primary HIV-1 infection. *J. Infect. Dis.* 204, 1557–1562.
- Hunt, P.W., Brenchley, J., Sinclair, E., McCune, J.M., Roland, M., Page-Shafer, K., Hsue, P., Emu, B., Krone, M., Lampiris, H., et al. (2008). Relationship between T cell activation and

CD4+ T cell count in HIV-seropositive individuals with undetectable plasma HIV RNA levels in the absence of therapy. *J. Infect. Dis.* 197, 126–133.

Hunt, P.W., Cao, H.L., Muzoora, C., Ssewanyana, I., Bennett, J., Emenyonu, N., Kembabazi, A., Neilands, T.B., Bangsberg, D.R., Deeks, S.G., et al. (2011a). Impact of CD8+ T-cell activation on CD4+ T-cell recovery and mortality in HIV-infected Ugandans initiating antiretroviral therapy. *AIDS Lond. Engl.* 25, 2123–2131.

Hunt, P.W., Landay, A.L., Sinclair, E., Martinson, J.A., Hatano, H., Emu, B., Norris, P.J., Busch, M.P., Martin, J.N., Brooks, C., et al. (2011b). A low T regulatory cell response may contribute to both viral control and generalized immune activation in HIV controllers. *PloS One* 6, e15924.

Hunt, P.W., Sinclair, E., Rodriguez, B., Shive, C., Clagett, B., Funderburg, N., Robinson, J., Huang, Y., Epling, L., Martin, J.N., et al. (2014). Gut Epithelial Barrier Dysfunction and Innate Immune Activation Predict Mortality in Treated HIV Infection. *J. Infect. Dis.*

Hyrca, M.D., Kovacs, C., Loutfy, M., Halpenny, R., Heisler, L., Yang, S., Wilkins, O., Ostrowski, M., and Der, S.D. (2007). Distinct transcriptional profiles in ex vivo CD4+ and CD8+ T cells are established early in human immunodeficiency virus type 1 infection and are characterized by a chronic interferon response as well as extensive transcriptional changes in CD8+ T cells. *J. Virol.* 81, 3477–3486.

Ivashkiv, L.B., and Donlin, L.T. (2014). Regulation of type I interferon responses. *Nat. Rev. Immunol.* 14, 36–49.

Jacobson, D.L., McCutchan, J.A., Spechko, P.L., Abramson, I., Smith, R.S., Bartok, A., Boss, G.R., Durand, D., Bozzette, S.A., and Spector, S.A. (1991). The evolution of lymphadenopathy and hypergammaglobulinemia are evidence for early and sustained polyclonal B lymphocyte activation during human immunodeficiency virus infection. *J. Infect. Dis.* 163, 240–246.

Jacquelin, B., Mayau, V., Targat, B., Liovat, A.-S., Kunkel, D., Petitjean, G., Dillies, M.-A., Roques, P., Butor, C., Silvestri, G., et al. (2009). Nonpathogenic SIV infection of African green monkeys induces a strong but rapidly controlled type I IFN response. *J. Clin. Invest.* 119, 3544–3555.

Jagannathan, P., Osborne, C.M., Royce, C., Manion, M.M., Tilton, J.C., Li, L., Fischer, S., Hallahan, C.W., Metcalf, J.A., McLaughlin, M., et al. (2009). Comparisons of CD8+ T cells specific for human immunodeficiency virus, hepatitis C virus, and cytomegalovirus reveal differences in frequency, immunodominance, phenotype, and interleukin-2 responsiveness. *J. Virol.* 83, 2728–2742.

Janbazian, L., Price, D.A., Canderan, G., Filali-Mouhim, A., Asher, T.E., Ambrozak, D.R., Scheinberg, P., Boulassel, M.R., Routy, J.-P., Koup, R.A., et al. (2012). Clonotype and repertoire changes drive the functional improvement of HIV-specific CD8 T cell populations under conditions of limited antigenic stimulation. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 188, 1156–1167.

- Jansen, C.A., De Cuyper, I.M., Hooibrink, B., van der Bij, A.K., van Baarle, D., and Miedema, F. (2006). Prognostic value of HIV-1 Gag-specific CD4⁺ T-cell responses for progression to AIDS analyzed in a prospective cohort study. *Blood* 107, 1427–1433.
- Jiao, Y., Xie, J., Li, T., Han, Y., Qiu, Z., Zuo, L., and Wang, A. (2006). Correlation between gag-specific CD8 T-cell responses, viral load, and CD4 count in HIV-1 infection is dependent on disease status. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 1999 42, 263–268.
- Jiao, Y., Zhang, T., Wang, R., Zhang, H., Huang, X., Yin, J., Zhang, L., Xu, X., and Wu, H. (2012). Plasma IP-10 is associated with rapid disease progression in early HIV-1 infection. *Viral Immunol.* 25, 333–337.
- Kalayjian, R.C., Machekano, R.N., Rizk, N., Robbins, G.K., Gandhi, R.T., Rodriguez, B.A., Pollard, R.B., Lederman, M.M., and Landay, A. (2010). Pretreatment levels of soluble cellular receptors and interleukin-6 are associated with HIV disease progression in subjects treated with highly active antiretroviral therapy. *J. Infect. Dis.* 201, 1796–1805.
- Kamat, A., Ancuta, P., Blumberg, R.S., and Gabuzda, D. (2010). Serological markers for inflammatory bowel disease in AIDS patients with evidence of microbial translocation. *PloS One* 5, e15533.
- Kamat, A., Misra, V., Cassol, E., Ancuta, P., Yan, Z., Li, C., Morgello, S., and Gabuzda, D. (2012). A plasma biomarker signature of immune activation in HIV patients on antiretroviral therapy. *PloS One* 7, e30881.
- Kamga, I., Kahi, S., Develioglu, L., Lichtner, M., Marañón, C., Deveau, C., Meyer, L., Goujard, C., Lebon, P., Sinet, M., et al. (2005). Type I interferon production is profoundly and transiently impaired in primary HIV-1 infection. *J. Infect. Dis.* 192, 303–310.
- Kannanganat, S., Kapogiannis, B.G., Ibegbu, C., Chennareddi, L., Goepfert, P., Robinson, H.L., Lennox, J., and Amara, R.R. (2007). Human immunodeficiency virus type 1 controllers but not noncontrollers maintain CD4 T cells coexpressing three cytokines. *J. Virol.* 81, 12071–12076.
- Kardava, L., Moir, S., Wang, W., Ho, J., Buckner, C.M., Posada, J.G., O'Shea, M.A., Roby, G., Chen, J., Sohn, H.W., et al. (2011). Attenuation of HIV-associated human B cell exhaustion by siRNA downregulation of inhibitory receptors. *J. Clin. Invest.* 121, 2614–2624.
- Kaser, A., Nagata, S., and Tilg, H. (1999). Interferon alpha augments activation-induced T cell death by upregulation of Fas (CD95/APO-1) and Fas ligand expression. *Cytokine* 11, 736–743.
- Kaufmann, D.E., and Walker, B.D. (2009). PD-1 and CTLA-4 inhibitory cosignaling pathways in HIV infection and the potential for therapeutic intervention. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 182, 5891–5897.
- Kawai, T., and Akira, S. (2011). Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity* 34, 637–650.
- Keele, B.F., Giorgi, E.E., Salazar-Gonzalez, J.F., Decker, J.M., Pham, K.T., Salazar, M.G., Sun, C., Grayson, T., Wang, S., Li, H., et al. (2008a). Identification and characterization of

transmitted and early founder virus envelopes in primary HIV-1 infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 7552–7557.

Keele, B.F., Tazi, L., Gartner, S., Liu, Y., Burgon, T.B., Estes, J.D., Thacker, T.C., Crandall, K.A., McArthur, J.C., and Burton, G.F. (2008b). Characterization of the follicular dendritic cell reservoir of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* 82, 5548–5561.

Killian, M.S., Fujimura, S.H., Hecht, F.M., and Levy, J.A. (2006). Similar changes in plasmacytoid dendritic cell and CD4 T-cell counts during primary HIV-1 infection and treatment. *AIDS Lond. Engl.* 20, 1247–1252.

Kim, C.J., McKinnon, L.R., Kovacs, C., Kandel, G., Huibner, S., Chege, D., Shahabi, K., Benko, E., Loutfy, M., Ostrowski, M., et al. (2013). Mucosal Th17 cell function is altered during HIV infection and is an independent predictor of systemic immune activation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 191, 2164–2173.

Kimball, P., McDougan, F., and Stirling, R. (2011). CXCR3 Expression Elevated on Peripheral CD8(+) Lymphocytes from HIV/HCV Coinfected Individuals. *Viral Immunol.* 24, 441–448.

Kirchhoff, F., and Silvestri, G. (2008). Is Nef the elusive cause of HIV-associated hematopoietic dysfunction? *J. Clin. Invest.* 118, 1622–1625.

Kløverpris, H.N., McGregor, R., McLaren, J.E., Ladell, K., Stryhn, A., Koofhethile, C., Brener, J., Chen, F., Riddell, L., Graziano, L., et al. (2014). Programmed death-1 expression on HIV-1 specific CD8+ T cells is shaped by epitope specificity, T-cell receptor clonotype usage and antigen load. *AIDS Lond. Engl.*

Knudsen, A., Katzenstein, T.L., Benfield, T., Jørgensen, N.R., Kronborg, G., Gerstoft, J., Obel, N., Kjær, A., and Lebech, A.-M. (2014). Plasma plasminogen activator inhibitor-1 predicts myocardial infarction in HIV-1-infected individuals. *AIDS Lond. Engl.* 28, 1171–1179.

Kramski, M., Gaeguta, A.J., Lichtfuss, G.F., Rajasuriar, R., Crowe, S.M., French, M.A., Lewin, S.R., Center, R.J., and Purcell, D.F.J. (2011). Novel sensitive real-time PCR for quantification of bacterial 16S rRNA genes in plasma of HIV-infected patients as a marker for microbial translocation. *J. Clin. Microbiol.* 49, 3691–3693.

Krishnan, S., Wilson, E.M.P., Sheikh, V., Rupert, A., Mendoza, D., Yang, J., Lempicki, R., Migueles, S.A., and Sereti, I. (2014). Evidence for innate immune system activation in HIV type 1-infected elite controllers. *J. Infect. Dis.* 209, 931–939.

Kuller, L.H., Tracy, R., Belloso, W., De Wit, S., Drummond, F., Lane, H.C., Ledergerber, B., Lundgren, J., Neuhaus, J., Nixon, D., et al. (2008). Inflammatory and coagulation biomarkers and mortality in patients with HIV infection. *PLoS Med.* 5, e203.

Kuri-Cervantes, L., Oca, G.S.-M. de, Ávila-Ríos, S., Hernández-Juan, R., and Reyes-Terán, G. (2014). Activation of NK cells is associated with HIV-1 disease progression. *J. Leukoc. Biol.* 96, 7–16.

Lacerda, H.R., Falcão, M. da C.C., de Albuquerque, V.M.G., Zírpoli, J.C., Miranda-Filho, D. de B., de Albuquerque, M. de F.P.M., Montarroyos, U., and Ximenes, R.A. de A. (2014).

Association of inflammatory cytokines and endothelial adhesion molecules with immunological, virological, and cardiometabolic disease in HIV-infected individuals. *J. Interferon Cytokine Res. Off. J. Int. Soc. Interferon Cytokine Res.* *34*, 385–393.

Laguet, N., Sobhian, B., Casartelli, N., Ringard, M., Chable-Bessia, C., Ségéral, E., Yatim, A., Emiliani, S., Schwartz, O., and Benkirane, M. (2011). SAMHD1 is the dendritic- and myeloid-cell-specific HIV-1 restriction factor counteracted by Vpx. *Nature* *474*, 654–657.

Lambotte, O., Taoufik, Y., de Goër, M.G., Wallon, C., Goujard, C., and Delfraissy, J.F. (2000). Detection of infectious HIV in circulating monocytes from patients on prolonged highly active antiretroviral therapy. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* *1999 23*, 114–119.

Lambotte, O., Chaix, M.-L., Gubler, B., Nasreddine, N., Wallon, C., Goujard, C., Rouzioux, C., Taoufik, Y., and Delfraissy, J.-F. (2004). The lymphocyte HIV reservoir in patients on long-term HAART is a memory of virus evolution. *AIDS Lond. Engl.* *18*, 1147–1158.

Lambotte, O., Boufassa, F., Madec, Y., Nguyen, A., Goujard, C., Meyer, L., Rouzioux, C., Venet, A., and Delfraissy, J.-F. (2005). HIV controllers: a homogeneous group of HIV-1-infected patients with spontaneous control of viral replication. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* *41*, 1053–1056.

Lambotte, O., Ferrari, G., Moog, C., Yates, N.L., Liao, H.-X., Parks, R.J., Hicks, C.B., Owzar, K., Tomaras, G.D., Montefiori, D.C., et al. (2009). Heterogeneous neutralizing antibody and antibody-dependent cell cytotoxicity responses in HIV-1 elite controllers. *AIDS Lond. Engl.* *23*, 897–906.

Lambotte, O., Pollara, J., Boufassa, F., Moog, C., Venet, A., Haynes, B.F., Delfraissy, J.-F., Saez-Cirion, A., and Ferrari, G. (2013). High antibody-dependent cellular cytotoxicity responses are correlated with strong CD8 T cell viral suppressive activity but not with B57 status in HIV-1 elite controllers. *PloS One* *8*, e74855.

Lamine, A., Caumont-Sarcos, A., Chaix, M.-L., Saez-Cirion, A., Rouzioux, C., Delfraissy, J.-F., Pancino, G., and Lambotte, O. (2007). Replication-competent HIV strains infect HIV controllers despite undetectable viremia (ANRS EP36 study). *AIDS Lond. Engl.* *21*, 1043–1045.

Lane, B.R., King, S.R., Bock, P.J., Strieter, R.M., Coffey, M.J., and Markovitz, D.M. (2003). The C-X-C chemokine IP-10 stimulates HIV-1 replication. *Virology* *307*, 122–134.

Lane, H.C., Davey, V., Kovacs, J.A., Feinberg, J., Metcalf, J.A., Herpin, B., Walker, R., Deyton, L., Davey, R.T., and Falloon, J. (1990). Interferon-alpha in patients with asymptomatic human immunodeficiency virus (HIV) infection. A randomized, placebo-controlled trial. *Ann. Intern. Med.* *112*, 805–811.

Lanier, L.L., Le, A.M., Civin, C.I., Loken, M.R., and Phillips, J.H. (1986). The relationship of CD16 (Leu-11) and Leu-19 (NKH-1) antigen expression on human peripheral blood NK cells and cytotoxic T lymphocytes. *J. Immunol. Baltim. Md* *1950 136*, 4480–4486.

Learmont, J.C., Geczy, A.F., Mills, J., Ashton, L.J., Raynes-Greenow, C.H., Garsia, R.J., Dyer, W.B., McIntyre, L., Oelrichs, R.B., Rhodes, D.I., et al. (1999). Immunologic and virologic

status after 14 to 18 years of infection with an attenuated strain of HIV-1. A report from the Sydney Blood Bank Cohort. *N. Engl. J. Med.* **340**, 1715–1722.

Lécuroux, C., Girault, I., Urrutia, A., Doisne, J.-M., Deveau, C., Goujard, C., Meyer, L., Sinet, M., and Venet, A. (2009a). Identification of a particular HIV-specific CD8⁺ T-cell subset with a CD27⁺ CD45RO⁻/RA⁺ phenotype and memory characteristics after initiation of HAART during acute primary HIV infection. *Blood* **113**, 3209–3217.

Lécuroux, C., Girault, I., Boutboul, F., Urrutia, A., Goujard, C., Meyer, L., Lambotte, O., Chaix, M.-L., Martinez, V., Autran, B., et al. (2009b). Antiretroviral therapy initiation during primary HIV infection enhances both CD127 expression and the proliferative capacity of HIV-specific CD8⁺ T cells. *AIDS Lond. Engl.* **23**, 1649–1658.

Lécuroux, C., Girault, I., Chéret, A., Versmisse, P., Nembot, G., Meyer, L., Rouzioux, C., Pancino, G., Venet, A., Sáez-Cirión, A., et al. (2013). CD8 T-cells from most HIV-infected patients lack ex vivo HIV-suppressive capacity during acute and early infection. *PloS One* **8**, e59767.

Lécuroux, C., Sáez-Cirión, A., Girault, I., Versmisse, P., Boufassa, F., Avettand-Fenoël, V., Rouzioux, C., Meyer, L., Pancino, G., Lambotte, O., et al. (2014). Both HLA-B*57 and plasma HIV RNA levels contribute to the HIV-specific CD8⁺ T cell response in HIV controllers. *J. Virol.* **88**, 176–187.

Lederer, S., Favre, D., Walters, K.-A., Prohl, S., Kanwar, B., Kasakow, Z., Baskin, C.R., Palermo, R., McCune, J.M., and Katze, M.G. (2009). Transcriptional profiling in pathogenic and non-pathogenic SIV infections reveals significant distinctions in kinetics and tissue compartmentalization. *PLoS Pathog.* **5**, e1000296.

Lederman, M.M., Calabrese, L., Funderburg, N.T., Clagett, B., Medvik, K., Bonilla, H., Gripshover, B., Salata, R.A., Taege, A., Lisgaris, M., et al. (2011). Immunologic failure despite suppressive antiretroviral therapy is related to activation and turnover of memory CD4 cells. *J. Infect. Dis.* **204**, 1217–1226.

Lee, S.A., Sinclair, E., Hatano, H., Hsue, P.Y., Epling, L., Hecht, F.M., Bangsberg, D.R., Martin, J.N., McCune, J.M., Deeks, S.G., et al. (2014). Impact of HIV on CD8⁺ T cell CD57 expression is distinct from that of CMV and aging. *PloS One* **9**, e89444.

Lefrère, J.J., Morand-Joubert, L., Mariotti, M., Bludau, H., Burghoffer, B., Petit, J.C., and Roudot-Thoraval, F. (1997). Even individuals considered as long-term nonprogressors show biological signs of progression after 10 years of human immunodeficiency virus infection. *Blood* **90**, 1133–1140.

Legendre, C., Raphael, M., Gras, G., Lefevre, E.A., Feuillard, J., Dormont, D., and Richard, Y. (1998). CD80 expression is decreased in hyperplastic lymph nodes of HIV⁺ patients. *Int. Immunol.* **10**, 1847–1851.

Lehmann, C., Lafferty, M., Garzino-Demo, A., Jung, N., Hartmann, P., Fätkenheuer, G., Wolf, J.S., van Lunzen, J., and Romerio, F. (2010). Plasmacytoid dendritic cells accumulate and secrete interferon alpha in lymph nodes of HIV-1 patients. *PloS One* **5**, e11110.

- Levy, D.E., Marié, I.J., and Durbin, J.E. (2011). Induction and function of type I and III interferon in response to viral infection. *Curr. Opin. Virol.* *1*, 476–486.
- Lewin, S.R., and Rouzioux, C. (2011). HIV cure and eradication: how will we get from the laboratory to effective clinical trials? *AIDS Lond. Engl.* *25*, 885–897.
- Lewin, S.R., Deeks, S.G., and Barré-Sinoussi, F. (2014). Towards a cure for HIV--are we making progress? *Lancet* *384*, 209–211.
- Li, Y., Migueles, S.A., Welcher, B., Svehla, K., Phogat, A., Louder, M.K., Wu, X., Shaw, G.M., Connors, M., Wyatt, R.T., et al. (2007). Broad HIV-1 neutralization mediated by CD4-binding site antibodies. *Nat. Med.* *13*, 1032–1034.
- Lichterfeld, M., Kaufmann, D.E., Yu, X.G., Mui, S.K., Addo, M.M., Johnston, M.N., Cohen, D., Robbins, G.K., Pae, E., Alter, G., et al. (2004). Loss of HIV-1-specific CD8+ T cell proliferation after acute HIV-1 infection and restoration by vaccine-induced HIV-1-specific CD4+ T cells. *J. Exp. Med.* *200*, 701–712.
- Lindqvist, M., van Lunzen, J., Soghoian, D.Z., Kuhl, B.D., Ranasinghe, S., Kranias, G., Flanders, M.D., Cutler, S., Yudanin, N., Muller, M.I., et al. (2012). Expansion of HIV-specific T follicular helper cells in chronic HIV infection. *J. Clin. Invest.* *122*, 3271–3280.
- Ling, B., Veazey, R.S., Luckay, A., Penedo, C., Xu, K., Lifson, J.D., and Marx, P.A. (2002). SIV(mac) pathogenesis in rhesus macaques of Chinese and Indian origin compared with primary HIV infections in humans. *AIDS Lond. Engl.* *16*, 1489–1496.
- Liovat, A.-S., Jacquelin, B., Ploquin, M.J., Barré-Sinoussi, F., and Müller-Trutwin, M.C. (2009). African non human primates infected by SIV - why don't they get sick? Lessons from studies on the early phase of non-pathogenic SIV infection. *Curr. HIV Res.* *7*, 39–50.
- Liovat, A.-S., Rey-Cuillé, M.-A., Lécuroux, C., Jacquelin, B., Girault, I., Petitjean, G., Zitoun, Y., Venet, A., Barré-Sinoussi, F., Lebon, P., et al. (2012). Acute plasma biomarkers of T cell activation set-point levels and of disease progression in HIV-1 infection. *PloS One* *7*, e46143.
- Liu, Y.-J. (2005). IPC: professional type 1 interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors. *Annu. Rev. Immunol.* *23*, 275–306.
- Liu, M., Guo, S., Hibbert, J.M., Jain, V., Singh, N., Wilson, N.O., and Stiles, J.K. (2011). CXCL10/IP-10 in infectious diseases pathogenesis and potential therapeutic implications. *Cytokine Growth Factor Rev.* *22*, 121–130.
- Liu, S.-Y., Sanchez, D.J., Aliyari, R., Lu, S., and Cheng, G. (2012). Systematic identification of type I and type II interferon-induced antiviral factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *109*, 4239–4244.
- Loffredo, J.T., Sidney, J., Bean, A.T., Beal, D.R., Bardet, W., Wahl, A., Hawkins, O.E., Piaskowski, S., Wilson, N.A., Hildebrand, W.H., et al. (2009). Two MHC class I molecules associated with elite control of immunodeficiency virus replication, Mamu-B*08 and HLA-B*2705, bind peptides with sequence similarity. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *182*, 7763–7775.

- Lu, J., Pan, Q., Rong, L., He, W., Liu, S.-L., and Liang, C. (2011). The IFITM proteins inhibit HIV-1 infection. *J. Virol.* *85*, 2126–2137.
- Lynch, H.E., Sanchez, A.M., D'Souza, M.P., Rountree, W., Denny, T.N., Kalos, M., and Sempowski, G.D. (2014). Development and implementation of a proficiency testing program for Luminex bead-based cytokine assays. *J. Immunol. Methods* *409*, 62–71.
- Lyons, J.L., Uno, H., Ancuta, P., Kamat, A., Moore, D.J., Singer, E.J., Morgello, S., and Gabuzda, D. (2011). Plasma sCD14 is a biomarker associated with impaired neurocognitive test performance in attention and learning domains in HIV infection. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* *1999* *57*, 371–379.
- Maartens, G., Celum, C., and Lewin, S.R. (2014). HIV infection: epidemiology, pathogenesis, treatment, and prevention. *Lancet* *384*, 258–271.
- Machmach, K., Leal, M., Gras, C., Viciana, P., Genebat, M., Franco, E., Boufassa, F., Lambotte, O., Herbeuval, J.P., and Ruiz-Mateos, E. (2012). Plasmacytoid dendritic cells reduce HIV production in elite controllers. *J. Virol.* *86*, 4245–4252.
- Madec, Y., Boufassa, F., Porter, K., Prins, M., Sabin, C., d' Arminio Monforte, A., Amornkul, P., Bartmeyer, B., Sannes, M., Venet, A., et al. (2013). Natural history of HIV-control since seroconversion. *AIDS Lond. Engl.* *27*, 2451–2460.
- Magierowska, M., Theodorou, I., Debré, P., Sanson, F., Autran, B., Rivière, Y., Charron, D., and Costagliola, D. (1999). Combined genotypes of CCR5, CCR2, SDF1, and HLA genes can predict the long-term nonprogressor status in human immunodeficiency virus-1-infected individuals. *Blood* *93*, 936–941.
- Mahalanabis, M., Jayaraman, P., Miura, T., Pereyra, F., Chester, E.M., Richardson, B., Walker, B., and Haigwood, N.L. (2009). Continuous viral escape and selection by autologous neutralizing antibodies in drug-naive human immunodeficiency virus controllers. *J. Virol.* *83*, 662–672.
- Malherbe, G., Steel, H.C., Cassol, S., de Oliveira, T., Seebregts, C.J., Anderson, R., Cassol, E., and Rossouw, T.M. (2014). Circulating biomarkers of immune activation distinguish viral suppression from nonsuppression in HAART-treated patients with advanced HIV-1 subtype C infection. *Mediators Inflamm.* *2014*, 198413.
- Malleret, B., Manéglier, B., Karlsson, I., Lebon, P., Nascimbeni, M., Perié, L., Brochard, P., Delache, B., Calvo, J., Andrieu, T., et al. (2008). Primary infection with simian immunodeficiency virus: plasmacytoid dendritic cell homing to lymph nodes, type I interferon, and immune suppression. *Blood* *112*, 4598–4608.
- Mangeat, B., Turelli, P., Caron, G., Friedli, M., Perrin, L., and Trono, D. (2003). Broad antiretroviral defence by human APOBEC3G through lethal editing of nascent reverse transcripts. *Nature* *424*, 99–103.
- Marchetti, G., Cozzi-Lepri, A., Merlini, E., Bellistri, G.M., Castagna, A., Galli, M., Verucchi, G., Antinori, A., Costantini, A., Giacometti, A., et al. (2011). Microbial translocation predicts disease progression of HIV-infected antiretroviral-naive patients with high CD4+ cell count. *AIDS Lond. Engl.* *25*, 1385–1394.

- Marquette, C.A., Corgier, B.P., and Blum, L.J. (2012). Recent advances in multiplex immunoassays. *Bioanalysis* 4, 927–936.
- Marras, F., Nicco, E., Bozzano, F., Di Biagio, A., Dentone, C., Pontali, E., Boni, S., Setti, M., Orofino, G., Mantia, E., et al. (2013). Natural killer cells in HIV controller patients express an activated effector phenotype and do not up-regulate Nkp44 on IL-2 stimulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 11970–11975.
- Marras, F., Bozzano, F., Ascierto, M.L., and De Maria, A. (2014). Baseline and Dynamic Expression of Activating NK Cell Receptors in the Control of Chronic Viral Infections: The Paradigm of HIV-1 and HCV. *Front. Immunol.* 5, 305.
- Martin, M.P., Qi, Y., Gao, X., Yamada, E., Martin, J.N., Pereyra, F., Colombo, S., Brown, E.E., Shupert, W.L., Phair, J., et al. (2007). Innate partnership of HLA-B and KIR3DL1 subtypes against HIV-1. *Nat. Genet.* 39, 733–740.
- Martinson, J.A., Montoya, C.J., Usuga, X., Ronquillo, R., Landay, A.L., and Desai, S.N. (2010). Chloroquine modulates HIV-1-induced plasmacytoid dendritic cell alpha interferon: implication for T-cell activation. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54, 871–881.
- De Masson, A., Kirilovsky, A., Zoorob, R., Avettand-Fenoel, V., Morin, V., Oudin, A., Descours, B., Rouzioux, C., and Autran, B. (2014). Blimp-1 overexpression is associated with low HIV-1 reservoir and transcription levels in central memory CD4+ T cells from elite controllers. *AIDS Lond. Engl.*
- Mastroianni, C.M., Lichtner, M., Mengoni, F., D'Agostino, C., d' Ettore, G., Forcina, G., Santopadre, P., Massetti, A.P., and Vullo, V. (2000). Changes in circulating levels of soluble cell adhesion molecules following highly active antiretroviral treatment of HIV-1-infected patients. *Clin. Immunol. Orlando Fla* 95, 212–217.
- Mattapallil, J.J., Douek, D.C., Hill, B., Nishimura, Y., Martin, M., and Roederer, M. (2005). Massive infection and loss of memory CD4+ T cells in multiple tissues during acute SIV infection. *Nature* 434, 1093–1097.
- Mavigner, M., Cazabat, M., Dubois, M., L'Faqihi, F.-E., Requena, M., Pasquier, C., Klopp, P., Amar, J., Alric, L., Barange, K., et al. (2012). Altered CD4+ T cell homing to the gut impairs mucosal immune reconstitution in treated HIV-infected individuals. *J. Clin. Invest.* 122, 62–69.
- Mavilio, D., Lombardo, G., Benjamin, J., Kim, D., Follman, D., Marcenaro, E., O'Shea, M.A., Kinter, A., Kovacs, C., Moretta, A., et al. (2005). Characterization of CD56-/CD16+ natural killer (NK) cells: a highly dysfunctional NK subset expanded in HIV-infected viremic individuals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 2886–2891.
- McCune, J.M. (2001). The dynamics of CD4+ T-cell depletion in HIV disease. *Nature* 410, 974–979.
- Meier, A., Bagchi, A., Sidhu, H.K., Alter, G., Suscovich, T.J., Kavanagh, D.G., Streeck, H., Brockman, M.A., LeGall, S., Hellman, J., et al. (2008). Upregulation of PD-L1 on monocytes and dendritic cells by HIV-1 derived TLR ligands. *AIDS Lond. Engl.* 22, 655–658.

- Mela, C.M., Burton, C.T., Imami, N., Nelson, M., Steel, A., Gazzard, B.G., Gotch, F.M., and Goodier, M.R. (2005). Switch from inhibitory to activating NKG2 receptor expression in HIV-1 infection: lack of reversion with highly active antiretroviral therapy. *AIDS Lond. Engl.* 19, 1761–1769.
- Michailidis, C., Giannopoulos, G., Vigklis, V., Armenis, K., Tsakris, A., and Gargalianos, P. (2012). Impaired phagocytosis among patients infected by the human immunodeficiency virus: implication for a role of highly active anti-retroviral therapy. *Clin. Exp. Immunol.* 167, 499–504.
- Migueles, S.A., Sabbaghian, M.S., Shupert, W.L., Bettinotti, M.P., Marincola, F.M., Martino, L., Hallahan, C.W., Selig, S.M., Schwartz, D., Sullivan, J., et al. (2000). HLA B*5701 is highly associated with restriction of virus replication in a subgroup of HIV-infected long term nonprogressors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 2709–2714.
- Migueles, S.A., Laborico, A.C., Imamichi, H., Shupert, W.L., Royce, C., McLaughlin, M., Ehler, L., Metcalf, J., Liu, S., Hallahan, C.W., et al. (2003). The differential ability of HLA B*5701+ long-term nonprogressors and progressors to restrict human immunodeficiency virus replication is not caused by loss of recognition of autologous viral gag sequences. *J. Virol.* 77, 6889–6898.
- Migueles, S.A., Osborne, C.M., Royce, C., Compton, A.A., Joshi, R.P., Weeks, K.A., Rood, J.E., Berkley, A.M., Sacha, J.B., Coglianò-Shutta, N.A., et al. (2008). Lytic granule loading of CD8+ T cells is required for HIV-infected cell elimination associated with immune control. *Immunity* 29, 1009–1021.
- Miura, T., Brockman, M.A., Brumme, C.J., Brumme, Z.L., Carlson, J.M., Pereyra, F., Trocha, A., Addo, M.M., Block, B.L., Rothchild, A.C., et al. (2008). Genetic characterization of human immunodeficiency virus type 1 in elite controllers: lack of gross genetic defects or common amino acid changes. *J. Virol.* 82, 8422–8430.
- Moir, S., Malaspina, A., Ogwaro, K.M., Donoghue, E.T., Hallahan, C.W., Ehler, L.A., Liu, S., Adelsberger, J., Lapointe, R., Hwu, P., et al. (2001). HIV-1 induces phenotypic and functional perturbations of B cells in chronically infected individuals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 10362–10367.
- Morlat, P., Roussillon, C., Henard, S., Salmon, D., Bonnet, F., Cacoub, P., Georget, A., Aouba, A., Rosenthal, E., May, T., et al. (2014). Causes of death among HIV-infected patients in France in 2010 (national survey): trends since 2000. *AIDS Lond. Engl.* 28, 1181–1191.
- Munroe, M.E., Vista, E.S., Guthridge, J.M., Thompson, L.F., Merrill, J.T., and James, J.A. (2014). Proinflammatory adaptive cytokine and shed tumor necrosis factor receptor levels are elevated preceding systemic lupus erythematosus disease flare. *Arthritis Rheumatol. Hoboken NJ* 66, 1888–1899.
- Naarding, M.A., Baan, E., Pollakis, G., and Paxton, W.A. (2007). Effect of chloroquine on reducing HIV-1 replication in vitro and the DC-SIGN mediated transfer of virus to CD4+ T-lymphocytes. *Retrovirology* 4, 6.
- Nascimbeni, M., Perié, L., Chorro, L., Diocou, S., Kreitmman, L., Louis, S., Garderet, L., Fabiani, B., Berger, A., Schmitz, J., et al. (2009). Plasmacytoid dendritic cells accumulate

in spleens from chronically HIV-infected patients but barely participate in interferon-alpha expression. *Blood* 113, 6112–6119.

Navis, M., Schellens, I., van Baarle, D., Borghans, J., van Swieten, P., Miedema, F., Kootstra, N., and Schuitemaker, H. (2007). Viral replication capacity as a correlate of HLA B57/B5801-associated nonprogressive HIV-1 infection. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 179, 3133–3143.

Navis, M., Schellens, I.M.M., van Swieten, P., Borghans, J.A.M., Miedema, F., Kootstra, N.A., van Baarle, D., and Schuitemaker, H. (2008). A nonprogressive clinical course in HIV-infected individuals expressing human leukocyte antigen B57/5801 is associated with preserved CD8+ T lymphocyte responsiveness to the HW9 epitope in Nef. *J. Infect. Dis.* 197, 871–879.

Ndhlovu, L.C., Chapman, J.M., Jha, A.R., Snyder-Cappione, J.E., Pagán, M., Leal, F.E., Boland, B.S., Norris, P.J., Rosenberg, M.G., and Nixon, D.F. (2008a). Suppression of HIV-1 plasma viral load below detection preserves IL-17 producing T cells in HIV-1 infection. *AIDS Lond. Engl.* 22, 990–992.

Ndhlovu, L.C., Loo, C.P., Spotts, G., Nixon, D.F., and Hecht, F.M. (2008b). FOXP3 expressing CD127^{lo} CD4⁺ T cells inversely correlate with CD38⁺ CD8⁺ T cell activation levels in primary HIV-1 infection. *J. Leukoc. Biol.* 83, 254–262.

Neil, S.J.D., Zang, T., and Bieniasz, P.D. (2008). Tetherin inhibits retrovirus release and is antagonized by HIV-1 Vpu. *Nature* 451, 425–430.

Nicoli, F., Finessi, V., Sicurella, M., Rizzotto, L., Gallerani, E., Destro, F., Cafaro, A., Marconi, P., Caputo, A., Ensoli, B., et al. (2013). The HIV-1 Tat protein induces the activation of CD8⁺ T cells and affects in vivo the magnitude and kinetics of antiviral responses. *PloS One* 8, e77746.

Noel, N., Boufassa, F., Lécuroux, C., Saez-Cirion, A., Bourgeois, C., Dunyach-Remy, C., Goujard, C., Rouzioux, C., Meyer, L., Pancino, G., et al. (2014). Elevated IP10 levels are associated with immune activation and low CD4⁺ T-cell counts in HIV controller patients. *AIDS Lond. Engl.* 28, 467–476.

Nordell, A.D., McKenna, M., Borges, Á.H., Duprez, D., Neuhaus, J., Neaton, J.D., INSIGHT SMART, ESPRIT Study Groups, and SILCAAT Scientific Committee (2014). Severity of cardiovascular disease outcomes among patients with HIV is related to markers of inflammation and coagulation. *J. Am. Heart Assoc.* 3, e000844.

Nordøy, I., Aukrust, P., Müller, F., and Frøland, S.S. (1996). Abnormal levels of circulating adhesion molecules in HIV-1 infection with characteristic alterations in opportunistic infections. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 81, 16–21.

O'Connell, K.A., Brennan, T.P., Bailey, J.R., Ray, S.C., Siliciano, R.F., and Blankson, J.N. (2010). Control of HIV-1 in elite suppressors despite ongoing replication and evolution in plasma virus. *J. Virol.* 84, 7018–7028.

Okulicz, J.F., Marconi, V.C., Landrum, M.L., Wegner, S., Weintrob, A., Ganesan, A., Hale, B., Crum-Cianflone, N., Delmar, J., Barthel, V., et al. (2009). Clinical outcomes of elite

controllers, viremic controllers, and long-term nonprogressors in the US Department of Defense HIV natural history study. *J. Infect. Dis.* 200, 1714–1723.

Okulicz, J.F., Grandits, G.A., Weintrob, A.C., Landrum, M.L., Ganesan, A., Crum-Cianflone, N.F., Agan, B.K., and Marconi, V.C. (2010). CD4 T cell count reconstitution in HIV controllers after highly active antiretroviral therapy. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 50, 1187–1191.

Olson, A.D., Meyer, L., Prins, M., Thiebaut, R., Gurdasani, D., Guiguet, M., Chaix, M.-L., Amornkul, P., Babiker, A., Sandhu, M.S., et al. (2014). An evaluation of HIV elite controller definitions within a large seroconverter cohort collaboration. *PloS One* 9, e86719.

Pahar, B., Amedee, A.M., Thomas, J., Dufour, J.P., Zhang, P., Nelson, S., Veazey, R.S., and Bagby, G.J. (2013). Effects of alcohol consumption on antigen-specific cellular and humoral immune responses to SIV in rhesus macaques. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 1999 64, 332–341.

Paiardini, M., and Müller-Trutwin, M. (2013). HIV-associated chronic immune activation. *Immunol. Rev.* 254, 78–101.

Paiardini, M., Cervasi, B., Reyes-Aviles, E., Micci, L., Ortiz, A.M., Chahroudi, A., Vinton, C., Gordon, S.N., Bosinger, S.E., Francella, N., et al. (2011). Low levels of SIV infection in sooty mangabey central memory CD4⁺ T cells are associated with limited CCR5 expression. *Nat. Med.* 17, 830–836.

Pandrea, I., Apetrei, C., Gordon, S., Barbercheck, J., Dufour, J., Bohm, R., Sumpter, B., Roques, P., Marx, P.A., Hirsch, V.M., et al. (2007). Paucity of CD4+CCR5⁺ T cells is a typical feature of natural SIV hosts. *Blood* 109, 1069–1076.

Pardridge, W.M., Yang, J., and Diagne, A. (1998). Chloroquine inhibits HIV-1 replication in human peripheral blood lymphocytes. *Immunol. Lett.* 64, 45–47.

Paton, N.I., Goodall, R.L., Dunn, D.T., Franzen, S., Collaco-Moraes, Y., Gazzard, B.G., Williams, I.G., Fisher, M.J., Winston, A., Fox, J., et al. (2012). Effects of hydroxychloroquine on immune activation and disease progression among HIV-infected patients not receiving antiretroviral therapy: a randomized controlled trial. *JAMA* 308, 353–361.

Pensiero, S., Cagigi, A., Palma, P., Nilsson, A., Capponi, C., Freda, E., Bernardi, S., Thorstensson, R., Chiodi, F., and Rossi, P. (2009). Timing of HAART defines the integrity of memory B cells and the longevity of humoral responses in HIV-1 vertically-infected children. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 7939–7944.

Pereyra, F., Addo, M.M., Kaufmann, D.E., Liu, Y., Miura, T., Rathod, A., Baker, B., Trocha, A., Rosenberg, R., Mackey, E., et al. (2008). Genetic and immunologic heterogeneity among persons who control HIV infection in the absence of therapy. *J. Infect. Dis.* 197, 563–571.

Pereyra, F., Lo, J., Triant, V.A., Wei, J., Buzon, M.J., Fitch, K.V., Hwang, J., Campbell, J.H., Burdo, T.H., Williams, K.C., et al. (2012). Increased coronary atherosclerosis and immune activation in HIV-1 elite controllers. *AIDS Lond. Engl.* 26, 2409–2412.

- Petro, T.M., Anderson, L.L., Gowler, J.S., Liu, X.J., and Schwartzbach, S.D. (2002). Smokeless tobacco extract decreases IL-12 production from LPS-stimulated but increases IL-12 from IFN-gamma-stimulated macrophages. *Int. Immunopharmacol.* 2, 345–355.
- Petrovas, C., Chaon, B., Ambrozak, D.R., Price, D.A., Melenhorst, J.J., Hill, B.J., Geldmacher, C., Casazza, J.P., Chattopadhyay, P.K., Roederer, M., et al. (2009). Differential association of programmed death-1 and CD57 with ex vivo survival of CD8+ T cells in HIV infection. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 183, 1120–1132.
- Piconi, S., Parisotto, S., Rizzardini, G., Passerini, S., Terzi, R., Argentero, B., Meraviglia, P., Capetti, A., Biasin, M., Trabattoni, D., et al. (2011). Hydroxychloroquine drastically reduces immune activation in HIV-infected, antiretroviral therapy-treated immunologic nonresponders. *Blood* 118, 3263–3272.
- Poli, G., Orenstein, J.M., Kinter, A., Folks, T.M., and Fauci, A.S. (1989). Interferon-alpha but not AZT suppresses HIV expression in chronically infected cell lines. *Science* 244, 575–577.
- Porichis, F., Hart, M.G., Zupkosky, J., Barblu, L., Kwon, D.S., McMullen, A., Brennan, T., Ahmed, R., Freeman, G.J., Kavanagh, D.G., et al. (2014). Differential impact of PD-1 and/or interleukin-10 blockade on HIV-1-specific CD4 T cell and antigen-presenting cell functions. *J. Virol.* 88, 2508–2518.
- Potter, S.J., Lacabartz, C., Lambotte, O., Perez-Patrigion, S., Vingert, B., Sinet, M., Colle, J.-H., Urrutia, A., Scott-Algara, D., Boufassa, F., et al. (2007). Preserved central memory and activated effector memory CD4+ T-cell subsets in human immunodeficiency virus controllers: an ANRS EP36 study. *J. Virol.* 81, 13904–13915.
- Price, D.A., Brenchley, J.M., Ruff, L.E., Betts, M.R., Hill, B.J., Roederer, M., Koup, R.A., Migueles, S.A., Gostick, E., Wooldridge, L., et al. (2005). Avidity for antigen shapes clonal dominance in CD8+ T cell populations specific for persistent DNA viruses. *J. Exp. Med.* 202, 1349–1361.
- Propato, A., Schiaffella, E., Vicenzi, E., Francavilla, V., Baloni, L., Paroli, M., Finocchi, L., Tanigaki, N., Ghezzi, S., Ferrara, R., et al. (2001). Spreading of HIV-specific CD8+ T-cell repertoire in long-term nonprogressors and its role in the control of viral load and disease activity. *Hum. Immunol.* 62, 561–576.
- Rachinger, A., Navis, M., van Assen, S., Groeneveld, P.H.P., and Schuitemaker, H. (2008). Recovery of viremic control after superinfection with pathogenic HIV type 1 in a long-term elite controller of HIV type 1 infection. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 47, e86–e89.
- Ragab, D., Laird, M., Duffy, D., Casrouge, A., Mamdouh, R., Abass, A., Shenawy, D.E., Shebl, A.M., Elkashef, W.F., Zalata, K.R., et al. (2013). CXCL10 antagonism and plasma sDPPIV correlate with increasing liver disease in chronic HCV genotype 4 infected patients. *Cytokine* 63, 105–112.
- Ramirez, L.A., Arango, T.A., Thompson, E., Naji, M., Tebas, P., and Boyer, J.D. (2014). High IP-10 levels decrease T cell function in HIV-1-infected individuals on ART. *J. Leukoc. Biol.*

Raposo, R.A.S., Abdel-Mohsen, M., Bilska, M., Montefiori, D.C., Nixon, D.F., and Pillai, S.K. (2013). Effects of cellular activation on anti-HIV-1 restriction factor expression profile in primary cells. *J. Virol.* *87*, 11924–11929.

Ravet, S., Scott-Algara, D., Bonnet, E., Tran, H.K., Tran, T., Nguyen, N., Truong, L.X., Theodorou, I., Barré-Sinoussi, F., Pancino, G., et al. (2007). Distinctive NK-cell receptor repertoires sustain high-level constitutive NK-cell activation in HIV-exposed uninfected individuals. *Blood* *109*, 4296–4305.

Redd, A.D., Dabita, D., Bream, J.H., Charvat, B., Laeyendecker, O., Kiwanuka, N., Lutalo, T., Kigozi, G., Tobian, A.A.R., Gamiel, J., et al. (2009). Microbial translocation, the innate cytokine response, and HIV-1 disease progression in Africa. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 6718–6723.

Rethi, B., Sammiceli, S., Amu, S., Pensieroso, S., Hejdeman, B., Schepis, D., Thang, P.H., and Chiodi, F. (2013). Concerted effect of lymphopenia, viraemia and T-cell activation on Fas expression of peripheral B cells in HIV-1-infected patients. *AIDS Lond. Engl.* *27*, 155–162.

Riveira-Muñoz, E., Ruiz, A., Pauls, E., Permanyer, M., Badia, R., Mothe, B., Crespo, M., Clotet, B., Brander, C., Ballana, E., et al. (2014). Increased expression of SAMHD1 in a subset of HIV-1 elite controllers. *J. Antimicrob. Chemother.* *69*, 3057–3060.

Rodger, A.J., Fox, Z., Lundgren, J.D., Kuller, L.H., Boesecke, C., Gey, D., Skoutelis, A., Goetz, M.B., and Phillips, A.N. (2009). Activation and coagulation biomarkers are independent predictors of the development of opportunistic disease in patients with HIV infection. *J. Infect. Dis.* *200*, 973–983.

Rönsholt, F.F., Ullum, H., Katzenstein, T.L., Gerstoft, J., and Ostrowski, S.R. (2013). Persistent inflammation and endothelial activation in HIV-1 infected patients after 12 years of antiretroviral therapy. *PloS One* *8*, e65182.

Rotger, M., Dang, K.K., Fellay, J., Heinzen, E.L., Feng, S., Descombes, P., Shianna, K.V., Ge, D., Günthard, H.F., Goldstein, D.B., et al. (2010). Genome-wide mRNA expression correlates of viral control in CD4+ T-cells from HIV-1-infected individuals. *PLoS Pathog.* *6*, e1000781.

Rotger, M., Dalmau, J., Rauch, A., McLaren, P., Bosinger, S.E., Martinez, R., Sandler, N.G., Roque, A., Liebner, J., Battegay, M., et al. (2011). Comparative transcriptomics of extreme phenotypes of human HIV-1 infection and SIV infection in sooty mangabey and rhesus macaque. *J. Clin. Invest.* *121*, 2391–2400.

Sabado, R.L., O'Brien, M., Subedi, A., Qin, L., Hu, N., Taylor, E., Dibben, O., Stacey, A., Fellay, J., Shianna, K.V., et al. (2010). Evidence of dysregulation of dendritic cells in primary HIV infection. *Blood* *116*, 3839–3852.

Sadler, A.J., and Williams, B.R.G. (2008). Interferon-inducible antiviral effectors. *Nat. Rev. Immunol.* *8*, 559–568.

Sáez-Cirión, A., Lacabartz, C., Lambotte, O., Versmisse, P., Urrutia, A., Boufassa, F., Barré-Sinoussi, F., Delfraissy, J.-F., Sinet, M., Pancino, G., et al. (2007). HIV controllers exhibit

potent CD8 T cell capacity to suppress HIV infection ex vivo and peculiar cytotoxic T lymphocyte activation phenotype. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 6776–6781.

Sáez-Cirión, A., Sinet, M., Shin, S.Y., Urrutia, A., Versmisse, P., Lacabartz, C., Boufassa, F., Avettand-Fènoël, V., Rouzioux, C., Delfraissy, J.-F., et al. (2009). Heterogeneity in HIV Suppression by CD8 T Cells from HIV Controllers: Association with Gag-Specific CD8 T Cell Responses. *J. Immunol.* *182*, 7828–7837.

Sáez-Cirión, A., Hamimi, C., Bergamaschi, A., David, A., Versmisse, P., Mélard, A., Boufassa, F., Barré-Sinoussi, F., Lambotte, O., Rouzioux, C., et al. (2011). Restriction of HIV-1 replication in macrophages and CD4+ T cells from HIV controllers. *Blood* *118*, 955–964.

Sáez-Cirión, A., Bacchus, C., Hocqueloux, L., Avettand-Fenoel, V., Girault, I., Lecuroux, C., Potard, V., Versmisse, P., Melard, A., Prazuck, T., et al. (2013). Post-Treatment HIV-1 Controllers with a Long-Term Virological Remission after the Interruption of Early Initiated Antiretroviral Therapy ANRS VISCONTI Study. *PLoS Pathog.* *9*, e1003211.

Salgado, M., Swanson, M.D., Pohlmeier, C.W., Buckheit, R.W., Wu, J., Archin, N.M., Williams, T.M., Margolis, D.M., Siliciano, R.F., Garcia, J.V., et al. (2014). HLA-B*57 elite suppressor and chronic progressor HIV-1 isolates replicate vigorously and cause CD4+ T cell depletion in humanized BLT mice. *J. Virol.* *88*, 3340–3352.

Samuelsson, A., Sönnnerborg, A., Heuts, N., Cöster, J., and Chiodi, F. (1997). Progressive B cell apoptosis and expression of Fas ligand during human immunodeficiency virus type 1 infection. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* *13*, 1031–1038.

Sanders, V.J., Pittman, C.A., White, M.G., Wang, G., Wiley, C.A., and Achim, C.L. (1998). Chemokines and receptors in HIV encephalitis. *AIDS Lond. Engl.* *12*, 1021–1026.

Sandler, N.G., Wand, H., Roque, A., Law, M., Nason, M.C., Nixon, D.E., Pedersen, C., Ruxrungtham, K., Lewin, S.R., Emery, S., et al. (2011). Plasma levels of soluble CD14 independently predict mortality in HIV infection. *J. Infect. Dis.* *203*, 780–790.

Sasseville, V.G., Smith, M.M., Mackay, C.R., Pauley, D.R., Mansfield, K.G., Ringler, D.J., and Lackner, A.A. (1996). Chemokine expression in simian immunodeficiency virus-induced AIDS encephalitis. *Am. J. Pathol.* *149*, 1459–1467.

Sato, M., Suemori, H., Hata, N., Asagiri, M., Ogasawara, K., Nakao, K., Nakaya, T., Katsuki, M., Noguchi, S., Tanaka, N., et al. (2000). Distinct and essential roles of transcription factors IRF-3 and IRF-7 in response to viruses for IFN- α /beta gene induction. *Immunity* *13*, 539–548.

Sauce, D., Larsen, M., Fastenackels, S., Pauchard, M., Ait-Mohand, H., Schneider, L., Guihot, A., Boufassa, F., Zaunders, J., Iguertsira, M., et al. (2011). HIV disease progression despite suppression of viral replication is associated with exhaustion of lymphopoiesis. *Blood* *117*, 5142–5151.

Sayah, D.M., Sokolskaja, E., Berthoux, L., and Luban, J. (2004). Cyclophilin A retrotransposition into TRIM5 explains owl monkey resistance to HIV-1. *Nature* *430*, 569–573.

- Schacker, T., Little, S., Connick, E., Gebhard, K., Zhang, Z.Q., Krieger, J., Pryor, J., Havlir, D., Wong, J.K., Schooley, R.T., et al. (2001). Productive infection of T cells in lymphoid tissues during primary and early human immunodeficiency virus infection. *J. Infect. Dis.* 183, 555–562.
- Scherberich, J.E., and Nockher, W.A. (1999). CD14⁺⁺ monocytes, CD14⁺/CD16⁺ subset and soluble CD14 as biological markers of inflammatory systemic diseases and monitoring immunosuppressive therapy. *Clin. Chem. Lab. Med. CCLM FESCC* 37, 209–213.
- Schindler, M., Schmökel, J., Specht, A., Li, H., Münch, J., Khalid, M., Sodora, D.L., Hahn, B.H., Silvestri, G., and Kirchhoff, F. (2008). Inefficient Nef-mediated downmodulation of CD3 and MHC-I correlates with loss of CD4⁺T cells in natural SIV infection. *PLoS Pathog.* 4, e1000107.
- Schneider, W.M., Chevillotte, M.D., and Rice, C.M. (2014). Interferon-stimulated genes: a complex web of host defenses. *Annu. Rev. Immunol.* 32, 513–545.
- Scott-Algara, D., Arnold, V., Didier, C., Kattan, T., Pirozzi, G., Barré-Sinoussi, F., and Pancino, G. (2008). The CD85j⁺ NK cell subset potently controls HIV-1 replication in autologous dendritic cells. *PloS One* 3, e1975.
- Sedaghat, A.R., German, J., Teslovich, T.M., Cofrancesco, J., Jr, Jie, C.C., Talbot, C.C., Jr, and Siliciano, R.F. (2008). Chronic CD4⁺ T-cell activation and depletion in human immunodeficiency virus type 1 infection: type I interferon-mediated disruption of T-cell dynamics. *J. Virol.* 82, 1870–1883.
- Shacklett, B.L. (2010). Immune responses to HIV and SIV in mucosal tissues: “location, location, location.” *Curr. Opin. HIV AIDS* 5, 128–134.
- Shacklett, B.L., and Ferre, A.L. (2011). Mucosal immunity in HIV controllers: the right place at the right time. *Curr. Opin. HIV AIDS* 6, 202–207.
- Shattock, R.J., and Moore, J.P. (2003). Inhibiting sexual transmission of HIV-1 infection. *Nat. Rev. Microbiol.* 1, 25–34.
- Shive, C.L., Mudd, J.C., Funderburg, N.T., Sieg, S.F., Kyi, B., Bazdar, D.A., Mangioni, D., Gori, A., Jacobson, J.M., Brooks, A.D., et al. (2014). Inflammatory cytokines drive CD4⁺ T-cell cycling and impaired responsiveness to interleukin 7: implications for immune failure in HIV disease. *J. Infect. Dis.* 210, 619–629.
- Simmons, R.P., Scully, E.P., Groden, E.E., Arnold, K.B., Chang, J.J., Lane, K., Lifson, J., Rosenberg, E., Lauffenburger, D.A., and Altfeld, M. (2013). HIV-1 infection induces strong production of IP-10 through TLR7/9-dependent pathways. *AIDS Lond. Engl.* 27, 2505–2517.
- Simonetta, F., Hua, S., Lécuroux, C., Gérard, S., Boufassa, F., Sáez-Cirión, A., Pancino, G., Goujard, C., Lambotte, O., Venet, A., et al. (2014). High Eomesodermin expression among CD57⁺ CD8⁺ T cells identifies a CD8⁺ T cell subset associated with viral control during chronic human immunodeficiency virus infection. *J. Virol.*

- Skillman, D.R., Malone, J.L., Decker, C.F., Wagner, K.F., Mapou, R.L., Liao, M.J., Testa, D., and Meltzer, M.S. (1996). Phase I trial of interferon alfa-n3 in early-stage human immunodeficiency virus type 1 disease: evidence for drug safety, tolerance, and antiviral activity. *J. Infect. Dis.* *173*, 1107–1114.
- Smith, A.J., Li, Q., Wietgreffe, S.W., Schacker, T.W., Reilly, C.S., and Haase, A.T. (2010). Host genes associated with HIV-1 replication in lymphatic tissue. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *185*, 5417–5424.
- Smith, M.S., Thresher, R.J., and Pagano, J.S. (1991). Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 morphogenesis in T cells by alpha interferon. *Antimicrob. Agents Chemother.* *35*, 62–67.
- Sperber, K., Louie, M., Kraus, T., Proner, J., Sapira, E., Lin, S., Stecher, V., and Mayer, L. (1995). Hydroxychloroquine treatment of patients with human immunodeficiency virus type 1. *Clin. Ther.* *17*, 622–636.
- Srinivasula, S., Lempicki, R.A., Adelsberger, J.W., Huang, C.-Y., Roark, J., Lee, P.I., Rupert, A., Stevens, R., Sereti, I., Lane, H.C., et al. (2011). Differential effects of HIV viral load and CD4 count on proliferation of naive and memory CD4 and CD8 T lymphocytes. *Blood* *118*, 262–270.
- Stacey, A.R., Norris, P.J., Qin, L., Haygreen, E.A., Taylor, E., Heitman, J., Lebedeva, M., DeCamp, A., Li, D., Grove, D., et al. (2009). Induction of a striking systemic cytokine cascade prior to peak viremia in acute human immunodeficiency virus type 1 infection, in contrast to more modest and delayed responses in acute hepatitis B and C virus infections. *J. Virol.* *83*, 3719–3733.
- Strathdee, S.A., Veugelers, P.J., Page-Shafer, K.A., McNulty, A., Moss, A.R., Schechter, M.T., van Griensven, G.J., and Coutinho, R.A. (1996). Lack of consistency between five definitions of nonprogression in cohorts of HIV-infected seroconverters. *AIDS Lond. Engl.* *10*, 959–965.
- Stylianou, E., Aukrust, P., Bendtzen, K., Müller, F., and Frøland, S.S. (2000). Interferons and interferon (IFN)-inducible protein 10 during highly active anti-retroviral therapy (HAART)-possible immunosuppressive role of IFN-alpha in HIV infection. *Clin. Exp. Immunol.* *119*, 479–485.
- Sui, Y., Potula, R., Dhillon, N., Pinson, D., Li, S., Nath, A., Anderson, C., Turchan, J., Kolson, D., Narayan, O., et al. (2004). Neuronal apoptosis is mediated by CXCL10 overexpression in simian human immunodeficiency virus encephalitis. *Am. J. Pathol.* *164*, 1557–1566.
- Sui, Y., Stehno-Bittel, L., Li, S., Loganathan, R., Dhillon, N.K., Pinson, D., Nath, A., Kolson, D., Narayan, O., and Buch, S. (2006). CXCL10-induced cell death in neurons: role of calcium dysregulation. *Eur. J. Neurosci.* *23*, 957–964.
- Von Sydow, M., Sönnnerborg, A., Gaines, H., and Strannegård, O. (1991). Interferon-alpha and tumor necrosis factor-alpha in serum of patients in various stages of HIV-1 infection. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* *7*, 375–380.

- Titanji, K., De Mito, A., Cagigi, A., Thorstensson, R., Grützmeier, S., Atlas, A., Hejdeman, B., Kroon, F.P., Lopalco, L., Nilsson, A., et al. (2006). Loss of memory B cells impairs maintenance of long-term serologic memory during HIV-1 infection. *Blood* 108, 1580–1587.
- Trono, D., Van Lint, C., Rouzioux, C., Verdin, E., Barré-Sinoussi, F., Chun, T.-W., and Chomont, N. (2010). HIV persistence and the prospect of long-term drug-free remissions for HIV-infected individuals. *Science* 329, 174–180.
- Veazey, R.S., Mansfield, K.G., Tham, I.C., Carville, A.C., Shvetz, D.E., Forand, A.E., and Lackner, A.A. (2000). Dynamics of CCR5 expression by CD4(+) T cells in lymphoid tissues during simian immunodeficiency virus infection. *J. Virol.* 74, 11001–11007.
- Vingert, B., Perez-Patrigéon, S., Jeannin, P., Lambotte, O., Boufassa, F., Lemaître, F., Kwok, W.W., Theodorou, I., Delfraissy, J.-F., Thèze, J., et al. (2010). HIV controller CD4+ T cells respond to minimal amounts of Gag antigen due to high TCR avidity. *PLoS Pathog.* 6, e1000780.
- Vingert, B., Benati, D., Lambotte, O., de Truchis, P., Slama, L., Jeannin, P., Galperin, M., Perez-Patrigéon, S., Boufassa, F., Kwok, W.W., et al. (2012). HIV controllers maintain a population of highly efficient Th1 effector cells in contrast to patients treated in the long term. *J. Virol.* 86, 10661–10674.
- Weiss, C.D. (2003). HIV-1 gp41: mediator of fusion and target for inhibition. *AIDS Rev.* 5, 214–221.
- Westrop, S.J., Qazi, N.A., Pido-Lopez, J., Nelson, M.R., Gazzard, B., Gotch, F.M., and Imami, N. (2009). Transient nature of long-term nonprogression and broad virus-specific proliferative T-cell responses with sustained thymic output in HIV-1 controllers. *PloS One* 4, e5474.
- Whittall, T., Peters, B., Rahman, D., Kingsley, C.I., Vaughan, R., and Lehner, T. (2011). Immunogenic and tolerogenic signatures in human immunodeficiency virus (HIV)-infected controllers compared with progressors and a conversion strategy of virus control. *Clin. Exp. Immunol.* 166, 208–217.
- Wickert, L.E., Karta, M.R., Audhya, A., Gern, J.E., and Bertics, P.J. (2014). Simvastatin attenuates rhinovirus-induced interferon and CXCL10 secretion from monocytic cells in vitro. *J. Leukoc. Biol.* 95, 951–959.
- Wilson, E.M.P., Singh, A., Hullsiek, K.H., Gibson, D., Henry, W.K., Lichtenstein, K., Onen, N.F., Kojic, E., Patel, P., Brooks, J.T., et al. (2014). Monocyte-Activation Phenotypes Are Associated With Biomarkers of Inflammation and Coagulation in Chronic HIV Infection. *J. Infect. Dis.* 210, 1396–1406.
- Wilson, N.O., Solomon, W., Anderson, L., Patrickson, J., Pitts, S., Bond, V., Liu, M., and Stiles, J.K. (2013). Pharmacologic inhibition of CXCL10 in combination with anti-malarial therapy eliminates mortality associated with murine model of cerebral malaria. *PloS One* 8, e60898.

Wu, J.Q., Dwyer, D.E., Dyer, W.B., Yang, Y.H., Wang, B., and Saksena, N.K. (2011). Genome-wide analysis of primary CD4+ and CD8+ T cell transcriptomes shows evidence for a network of enriched pathways associated with HIV disease. *Retrovirology* 8, 18.

Wu, J.Q., Sassé, T.R., Saksena, M.M., and Saksena, N.K. (2013a). Transcriptome analysis of primary monocytes from HIV-positive patients with differential responses to antiretroviral therapy. *Virol. J.* 10, 361.

Wu, J.Q., Sassé, T.R., Wolkenstein, G., Conceicao, V., Saksena, M.M., Soedjono, M., Perera, S.S., Wang, B., Dwyer, D.E., and Saksena, N.K. (2013b). Transcriptome analysis of primary monocytes shows global down-regulation of genetic networks in HIV viremic patients versus long-term non-progressors. *Virology* 435, 308–319.

Xu, X., Qiu, C., Zhu, L., Huang, J., Li, L., Fu, W., Zhang, L., Wei, J., Wang, Y., Geng, Y., et al. (2014). IFN-Stimulated Gene LY6E in Monocytes Regulates the CD14/TLR4 Pathway but Inadequately Restrains the Hyperactivation of Monocytes during Chronic HIV-1 Infection. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 193, 4125–4136.

Younes, S.-A., Yassine-Diab, B., Dumont, A.R., Boulassel, M.-R., Grossman, Z., Routy, J.-P., and Sekaly, R.-P. (2003). HIV-1 viremia prevents the establishment of interleukin 2-producing HIV-specific memory CD4+ T cells endowed with proliferative capacity. *J. Exp. Med.* 198, 1909–1922.

Yukl, S.A., Sinclair, E., Somsouk, M., Hunt, P.W., Epling, L., Killian, M., Girling, V., Li, P., Havlir, D.V., Deeks, S.G., et al. (2014). A comparison of methods for measuring rectal HIV levels suggests that HIV DNA resides in cells other than CD4+ T cells, including myeloid cells. *AIDS Lond. Engl.* 28, 439–442.

Zeng, M., Smith, A.J., Wietgreffe, S.W., Southern, P.J., Schacker, T.W., Reilly, C.S., Estes, J.D., Burton, G.F., Silvestri, G., Lifson, J.D., et al. (2011). Cumulative mechanisms of lymphoid tissue fibrosis and T cell depletion in HIV-1 and SIV infections. *J. Clin. Invest.* 121, 998–1008.

Zhang, J.-Y., Zhang, Z., Wang, X., Fu, J.-L., Yao, J., Jiao, Y., Chen, L., Zhang, H., Wei, J., Jin, L., et al. (2007). PD-1 up-regulation is correlated with HIV-specific memory CD8+ T-cell exhaustion in typical progressors but not in long-term nonprogressors. *Blood* 109, 4671–4678.

Zhang, Y.J., Fracasso, C., Fiore, J.R., Björndal, A., Angarano, G., Gringeri, A., and Fenyö, E.M. (1997). Augmented serum neutralizing activity against primary human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) isolates in two groups of HIV-1-infected long-term nonprogressors. *J. Infect. Dis.* 176, 1180–1187.

Zhang, Z., Schuler, T., Zupancic, M., Wietgreffe, S., Staskus, K.A., Reimann, K.A., Reinhart, T.A., Rogan, M., Cavert, W., Miller, C.J., et al. (1999). Sexual transmission and propagation of SIV and HIV in resting and activated CD4+ T cells. *Science* 286, 1353–1357.

Zheng, L., Taiwo, B., Gandhi, R.T., Hunt, P.W., Collier, A.C., Flexner, C., and Bosch, R.J. (2014). Factors associated with CD8+ T-cell activation in HIV-1-infected patients on long-term antiretroviral therapy. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 1999.

Zhu, T., Muthui, D., Holte, S., Nickle, D., Feng, F., Brodie, S., Hwangbo, Y., Mullins, J.I., and Corey, L. (2002). Evidence for human immunodeficiency virus type 1 replication in vivo in CD14(+) monocytes and its potential role as a source of virus in patients on highly active antiretroviral therapy. *J. Virol.* 76, 707–716.

Ziegler-Heitbrock, L., Ancuta, P., Crowe, S., Dalod, M., Grau, V., Hart, D.N., Leenen, P.J.M., Liu, Y.-J., MacPherson, G., Randolph, G.J., et al. (2010). Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood* 116, e74–e80.

Zimmermann, H.W., Trautwein, C., and Tacke, F. (2012). Functional role of monocytes and macrophages for the inflammatory response in acute liver injury. *Front. Physiol.* 3, 56.

ANNEXES

Annexe 1 – Les patients HIV controllers : un modèle de contrôle spontané de l'infection par le VIH

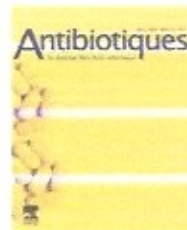
Nicolas Noel, Olivier Lambotte

Article de revue publié dans *Antibiotiques* (Noel N. & Lambotte O., *Antibiotiques* 2010;12;152-9)



Disponible en ligne sur
ScienceDirect
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France
EM|consulte
www.em-consulte.com



INFECTIONS VIRALES – ANTIVIRAUX

Les patients *HIV controllers* : un modèle de contrôle spontané de l'infection par le VIH

HIV controllers: A model of spontaneous control of HIV1 infection

N. Noel^{a,b}, O. Lambotte^{a,b,*}

^a Service de médecine interne et maladies infectieuses, hôpital Bicêtre, AP-HP, CHU Bicêtre, 94276 Le Kremlin-Bicêtre cedex, France

^b Unité U 802, Inserm, faculté de médecine Paris Sud, 63, rue Gabriel-Péri, 94276 Le Kremlin-Bicêtre, France

MOTS CLÉS

HIV controllers ;
Elite controllers ;
Lymphocytes T CD8 ;
Système immunitaire ;
Charge virale ARN

Résumé Les patients *HIV controllers* (HIC) forment un groupe homogène de patients infectés par le VIH1 définis par leur capacité à maintenir une charge virale indétectable sans traitement. Ces sujets, rares, représentent un modèle unique afin de tenter d'élucider les mécanismes conduisant au contrôle du VIH et aider au développement d'un vaccin. Les souches virales retrouvées chez ces patients ne sont pas déficientes et il ne semble pas y avoir de facteur intrinsèque de résistance : les lymphocytes T CD4 de ces patients sont infectés in vitro normalement par le VIH. Le contrôle du virus fait intervenir le système immunitaire. Si la réponse humorale par anticorps neutralisants (AcN) ne semble pas prépondérante (en dehors de l'activité *antibody dependant cell cytotoxicity* [ADCC]), la réponse immunitaire cellulaire est très importante. Notamment, la réponse lymphocytaire T CD8 spécifique anti-gag est poly-fonctionnelle et conduit à l'élimination par cytotoxicité directe des lymphocytes T4 infectés. Elle est restreinte par les molécules du CMH de type I, et les allèles HLA B57 et B27 sont surreprésentés chez les HIC. La réponse T CD4 spécifique est présente, avec la préservation des lymphocytes mémoires centraux et une avidité accrue des lymphocytes T CD4 spécifiques. Ce contrôle antiviral par le système immunitaire pourrait se mettre en place très tôt au cours de l'infection, nécessitant plusieurs facteurs concourant à l'établissement du statut HIC. Ainsi, l'immunité naturelle pourrait jouer un rôle important, de même que certains facteurs génétiques. La compréhension de ces mécanismes serait déterminante pour les stratégies thérapeutiques (immunothérapie, vaccins). Pour avancer dans la compréhension du contrôle du virus et connaître le devenir à long terme des patients *controllers*, une cohorte française (Agence nationale de recherche pour le Sida [ANRS] CO18 HIC) est ouverte.
© 2010 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

KEYWORDS

HIV controllers;

Summary *HIV controllers* (HIC) constitute a homogeneous subset of untreated HIV1 infected patients with prolonged undetectable viral load. They are defined according to a virological definition. Characteristics of these rare patients may help to understand how HIV1 replication

* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : olivier.lambotte@bct.aphp.fr (O. Lambotte).

Elite controllers;
CD8 T lymphocyte;
Immune system;
RNA viral load

can be controlled. This could lead to help vaccine development. These patients are infected by replication competent virus strains. Their CD4 T cells are fully susceptible to HIV infection, and till now, no intrinsic host resistance factor has been found. Control of the virus is related to an immune pathway. Humoral immune response (neutralizing antibodies) is heterogeneous but Antibody Dependent Cell Cytotoxicity (ADCC) seems to be higher in controllers. T cell immune response seems to be the most important. Specific anti-gag CD8+ T cell response is multifunctional and leads to elimination of infected CD4+ T cells by cytotoxic mechanisms. This response is HLA I restricted, and HLA B27 and B57 alleles are overrepresented in HIC. Specific CD4+ T cell response and central memory T cells are preserved. High avidity of HIV-specific CD4 T cells allows a rapid anti-HIV response. This anti-HIV1 control may be efficient early after the infection. Innate immunity combined with unknown genetic factors may be important. A better knowledge of the mechanisms underlying this spontaneous control of HIV infection should help to provide new clues for the design of therapeutic strategies or vaccine. To better understand the mechanisms explaining the rare HIV controller phenotype and to facilitate the long-term follow-up of these rare patients, a French cohort (Agence nationale de recherche pour le Sida [ANRS] CO18 HIC) was created.

© 2010 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Abréviations

| | |
|--------------|--|
| AcN | Anticorps neutralisants |
| ADCC | antibody dependant cell cytotoxicity |
| ADN | acide déoxyribo nucléique |
| ALT | asymptomatiques à long terme |
| ANRS | Agence nationale de recherche sur le SIDA et les hépatites |
| ARN | acide ribonucléique |
| CMH | complexe majeur d'histocompatibilité |
| Fab | fragment antigen binding |
| HAART | highly active anti-retroviral therapy |
| HIC | HIV controllers |
| HIV | human immunodeficiency virus |
| HLA | human leucocyte antigen |
| IFN | interféron |
| IL | interleukine |
| KIR | killer immunoglobulin-like receptors |
| LNTp | long-term non-progressors |
| LT | lymphocyte T |
| MIC (A et B) | MHC class I chain related molecules (A et B) |
| NCR | natural cytotoxicity receptor |
| NK | natural killer |
| NKG2D | natural killer group 2, member D |
| SIDA | syndrome d'immunodéficience acquise |
| SNP | single-nucleotide polymorphisms |
| VIH | Virus de l'immunodéficience humaine |

Introduction

L'infection par le virus du VIH mène chez la majorité des patients à un déclin du nombre de lymphocytes T CD4 et au stade Sida. Les thérapeutiques antirétrovirales ont permis d'améliorer grandement la survie, ainsi que la qualité de vie des patients. Néanmoins, ces traitements sont, jusqu'à ce jour, incapables d'éradiquer le virus.

Cependant, dans les années 1990–1995, plusieurs équipes ont constaté l'existence de patients « asymptomatiques à long terme » (ALT) ou *long-term non-progressors* (LNTp). Ces sujets sont définis sur une base immunologique, à savoir le

maintien prolongé sans traitement d'un taux de lymphocytes T CD4 élevé. Ils représentent 5 à 10 % des patients infectés par le VIH [1,2]. Leur fréquence est néanmoins variable selon les définitions utilisées [3].

Ce groupe de patients représente un grand intérêt dans la compréhension des mécanismes immunologiques sous-tendant la pathogénie de l'infection par le VIH. Néanmoins, ces patients sont hétérogènes car les valeurs de leurs charges virales sont très variables. Chez de nombreux patients ALT en effet, au fil des années, la charge virale augmente et le taux de T CD4 diminue, une évolution vers le stade Sida étant observée [1].

Dans la compréhension des mécanismes du contrôle immunitaire de l'infection par le VIH, l'identification en 2004–2005 d'un sous-groupe de patients chez qui la réplication virale est spontanément indétectable sans traitement a été primordiale. Ces patients rares sont décrits simultanément aux États-Unis et en France, sous le nom de *elite controllers*, *elite suppressors*, *elite non-progressors* ou *HIV controllers* (HIC). En 2005, notre équipe a défini un patient HIC comme une personne ayant été infectée par le VIH-1 depuis plus de dix ans, chez qui 90 % des charges virales sont indétectables (< 400 copies ARN/mL) sans aucun traitement [4]. Le seuil de 400 copies a été choisi car il correspond aux seuils de détection des premières techniques de quantification de charge virale utilisées dans les années 1995. Ces patients représentent environ 0,6 % des sujets infectés. Ils sont définis exclusivement sur un plan virologique, et non immunologique, le taux de lymphocytes T CD4 n'étant pas pris en compte (seule une partie d'entre eux répond aussi à la définition immunologique des patients ALT [Tableau 1]).

En 2009, le groupe de D. Costagliola a publié certaines caractéristiques de ces patients [5]. Parmi les 46 880 sujets infectés par le VIH1 dans la base de données hospitalière française en 2005, 0,22 % ($n = 101$) des sujets répondaient à la définition HIC, et 0,15 % ($n = 69$) à celle de *elite controllers* (définis par une charge virale < 50 copies/mL). À noter que 0,4 % ($n = 202$) des patients étaient considérés comme ALT ; par ailleurs, 46 % des *elite controllers* français étaient également ALT. Cette prévalence des patients *elite controllers* est retrouvée dans une récente étude américaine qui

Tableau 1 Caractéristiques immunovirologiques des patients « asymptomatiques à long terme » (ALT) et HIV controllers (HIC).
Immunologic and virologic characteristics of long-term non-progressors (LTNP) and HIV controllers (HIC).

| Définition | ALT | HIC |
|--------------------------------------|-----------------------|----------------------------------|
| | Immunologique | Virologique |
| Prévalence parmi les sujets infectés | 0,40 % ^a | 0,22 % |
| Taux de charge virale | Variable | < 400 copies/mL (par définition) |
| Taux de LT CD4 | > 500/mm ³ | Variable mais souvent élevé |
| Progression au stade SIDA | Oui, à long terme | Rare |

Grabar et al. [5].

ALT : asymptomatiques à long terme ; HIC : HIV controllers.

^a Variable selon les études (de 0,4 à 5 %).

sépare les patients *controllers* en *elite controller* (≥ 3 charges virales < 50 copies/mL sur au moins un an) (0,55 %) et en *viremic controller* (≥ 3 charges virales < 2000 copies/mL sur au moins un an) (3,34 %) [6].

Trois hypothèses complémentaires peuvent expliquer ce contrôle spontané du VIH : le rôle du virus lui-même (virus atténué ?), le rôle du terrain génétique du patient et enfin la nature de la réponse immunitaire anti-virale. L'étude des caractéristiques virologiques, génétiques et immunologiques de ces patients est donc fondamentale afin d'améliorer la compréhension du contrôle spontané de la réplication du VIH.

En 2005, nous avons mis en place un consortium d'équipes de recherche soutenu par l'Agence nationale de recherche pour le Sida (ANRS) afin d'explorer ces différentes hypothèses puis une cohorte nationale, la cohorte ANRS CO18 HIC qui a pris le relais d'un observatoire national en 2009. Les résultats obtenus ainsi que les données de la littérature sur ce sujet sont décrits ci-dessous.

Pathogénicité du virus

Chez les patients ALT, la réplication virale est détectable dans la majorité des cas. Néanmoins, les charges virales sont très variables dans ce groupe très hétérogène [1]. Des souches déficientes du VIH ont pu être mises en évidence, en particulier liées à des mutations dans les gènes *Vpr*, *Vif* ou *Nef*, avec des capacités répliquatives réduites [7,8].

L'indétectabilité de la charge virale ainsi que les faibles quantités d'ADN viral détectées ont fait évoquer la possibilité de souches virales atténuées chez les patients HIC, au vu des publications précédentes [4]. Cependant, plusieurs équipes ont montré que les patients HIC sont globalement infectés par des souches virales normalement répliquatives [9–11]. En effet, les souches virales isolées des cultures de lymphocytes T CD4 activés sont compétentes pour la réplication in vitro, sont capables d'infecter des lymphocytes T CD4 hétérologues et l'analyse génomique des souches de VIH isolées ne montre que de rares mutations dans les régions *nef*, *LTR* et *vif*, sans retentissement sur les fonctions virales [10,11]. En outre, l'absence d'anomalie répliquative est confirmée par l'existence d'une réplication virale très faible, de l'ordre de quelques copies d'ARN/mL, chez les patients HIC [12].

Il ne semble pas exister d'argument pour des souches virales déficientes qui expliqueraient le contrôle spontané de l'infection chez les patients HIC.

Susceptibilité de l'hôte

Afin de pénétrer dans le lymphocyte T CD4, le VIH utilise la molécule CD4 et un corécepteur, qui est un récepteur de chimiokines. Deux ont été identifiés : CCR5 et CXCR4. La délétion de 32 paires de base ($\Delta 32$) dans une région codante du corécepteur CCR5 est associée chez certains patients à un phénotype de résistance à l'infection et une plus faible progression [13]. À l'état homozygote, cette mutation confère une résistance complète in vitro à l'infection par des souches VIH1 R5. Cependant, nous n'avons pas retrouvé de mutation delta 32 chez les patients HIC [4,13].

L'implication de mécanismes de l'immunité innée anti-virale, comme les facteurs de restriction des infections rétrovirales et les cytidine déaminases, a également été évoquée. Le gène *TRIM5 α* produit une protéine ciblant la capsid virale et restreint la rétro-transcription du SIV chez le singe macaque Rhesus, conférant sa résistance à l'infection. Cependant, chez l'homme, le facteur de restriction Ref-1, appartenant à la même famille que *TRIM5 α* , est inefficace contre le VIH1 [14,15]. Intervenant plus tardivement au cours du cycle, la cytidine déaminase APOBEC3G induit la dégradation du génome du VIH et restreint la réplication du virus. Néanmoins, elle ne semble pas être un mécanisme déterminant chez les patients HIC [16,17].

Par ailleurs, les lymphocytes T CD4 de ces patients sont infectés sans difficulté par différentes souches virales, qu'elles soient « sauvages » ou « de laboratoire » et qu'elles utilisent CCR5 ou CXCR4. Les niveaux de réplication obtenus sont identiques à ceux observés lors de l'infection de lymphocytes T CD4 de donneurs sains [18].

Il n'y a pas de blocage de l'infection par le VIH dans les lymphocytes T CD4 des patients HIC.

Parmi les autres facteurs impliqués dans le contrôle de l'infection, le rôle des molécules du CMH a été étudié. Notamment, la présence des allèles HLA B57 et B27, ainsi que l'absence de B35, est associée au phénotype HIC [19]. Chez les patients *controllers*, il existe une surreprésentation de HLA B57*01. Le rôle de ces molécules pourrait être en lien avec l'activation de cellules de l'immunité innée, telles les cellules NK, conduisant à la destruction de la cellule infectée. En effet, une association protectrice a pu être montrée entre certains allèles du gène *KIR3DL1* et certaines molécules du groupe HLA-Bw4 contenant une isoleucine en position 80—dont HLA-B57 et B27. L'engagement d'autres récepteurs activateurs, tels *KIR3DS1*, ou la perte du signal

inhibiteur médiée par KIR3DL1 pourrait entraîner dans ces conditions une activation efficace des cellules NK [20].

En 2007, la cohorte Euro-CHAVI a réalisé une étude génomique utilisant des *single nucleotide polymorphisms* (SNP) visant à caractériser les polymorphismes associés à un meilleur contrôle de la charge virale [21]. Deux régions d'intérêt ont été mises en évidence : l'une proche de HLA B57*01, l'autre à proximité de HLA-C. En 2008, le groupe français a réalisé la première analyse de génomique sur les patients issus de la cohorte PRIMO (patients inclus en primo-infection) et sur les patients HIC. L'équipe de I. Theodorou a retrouvé les mêmes SNP que Fellay et mis en évidence des SNP à proximité des régions des gènes *MICA* et *MICB*, ligands de NKG2D, un récepteur activateur des cellules NK et des lymphocytes T CD8 activés. La voie NKG2D-MIC est impliquée dans l'immunité innée et les protéines MIC sont très polymorphiques. Leurs polymorphismes alléliques pourraient être associés à une charge virale plus basse [22].

Certains génotypes de molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH), comme HLA B57*01, sont associés à un meilleur contrôle de la réplication virale chez les patients infectés par le VIH.

Rôle de l'immunité humorale

L'analyse du rôle des anticorps neutralisants (AcN) dans le contrôle antiviral des personnes infectées par le VIH est un sujet d'étude important, notamment pour l'établissement d'un vaccin antiviral. Au cours de l'infection par le VIH, ces anticorps apparaissent rapidement, ont pour but de bloquer la propagation virale et sont impliqués dans la réponse immune (réponse NK, ADCC). Ces anticorps peuvent être dirigés contre divers antigènes viraux, les épitopes d'intérêt les plus étudiés se situant sur la protéine d'enveloppe (*env*), au niveau de la gp120, de la gp41 et du CD4bs [23,24]. Néanmoins, l'efficacité de ces anticorps est faible chez les patients progressifs et leur taux diminue avec le temps.

Le rôle des AcN a été suggéré, du moins partiellement, dans le contrôle antiviral des patients HIC [25]. Le groupe de Mahalanabis et al. suggèrent, en étudiant des sujets *viremic controllers* (50–2000 copies/mL) et *elite controllers* (< 50 copies/mL), que l'existence d'AcN, spécifiques d'épitopes de *env*, conduit à une pression de sélection sur les souches virales [26].

Néanmoins, ces données sont controversées. Plusieurs groupes ont montré que les taux d'AcN, qu'ils soient dirigés contre le virus autologue comme contre des souches hétérologues, étaient plus faibles chez les contrôleurs que chez des patients virémiques, suggérant que l'absence d'exposition antigénique chez les *controllers* diminuait la synthèse d'anticorps [27,28]. Ces données sont en accord avec ce que nous avons observé ainsi que le groupe de B. Walker en étudiant davantage de patients *controllers* : il existe une hétérogénéité importante dans les titres d'AcN selon les patients que l'on regarde les AcN « classiques » qui inhibent la réplication virale par le *fragment antigen binding* (Fab) ou ceux qui inhibent le virus par le biais du *fragment Fc* [29,30]. En outre, la spécificité des AcN et leur taux ne sont pas corrélés à l'intensité de la réponse T CD8 spécifique [29]. En revanche, des données préliminaires semblent indiquer une plus forte activité ADCC chez les patients HIC [29].

Les AcN ne semblent pas jouer un rôle essentiel chez les patients HIC.

Rôle de l'immunité cellulaire T CD4

Chez les patients progressifs, l'infection par le VIH provoque, et ce dès la primo-infection, un défaut quantitatif et qualitatif des lymphocytes T CD4, notamment des LT CD4 mémoires centraux. En particulier, ces cellules perdent leurs capacités de prolifération en réponse aux antigènes viraux, et de production de cytokines telles que l'IL2 [31,32]. Seule la population de LT CD4 producteurs d'IFN γ persiste. Cet ensemble d'anomalies des lymphocytes T *helper* explique en partie le défaut de mise en place d'une réponse immunitaire efficace précoce chez les patients progressifs.

Au sein des patients HIC, le nombre de lymphocytes T CD4 mémoires centraux persiste, et leur fonctionnalité évaluée par leurs capacités de production d'IL2 et de prolifération à la stimulation antigénique est préservée [33–35]. S. Potter et al. [34] montrent par ailleurs le maintien d'un pool de lymphocytes T CD4 mémoires effecteurs polyfonctionnels et le maintien d'une réponse T CD4 spécifique anti-HIV chez 11 HIC. L'importance de cette réponse spécifique anti-VIH polyfonctionnelle est soulignée par le groupe de S. Deeks, pour lequel le nombre de lymphocytes T CD4 spécifiques de la protéine gag polyfonctionnels IL-2+ IFN γ + serait l'un des meilleurs marqueurs associés au contrôle de la charge virale, et par d'autres groupes tel celui de Kannanganat et al. [36,37]. Ce dernier groupe, étudiant différents types de patients, montre que la production par les lymphocytes T CD4 spécifiques anti-gag de IL2, TNF α et IFN γ est préservée chez les *controllers* et que ce pourcentage de cellules « triples productrices » semble inversement corrélé au taux de charge virale. Récemment, le groupe de Lisa Chakrabarti a mis en évidence la présence de clones T CD4 spécifiques de certaines épitopes de gag dotés d'une grande avidité (Vingert et al. PLoS Pathogen [sous presse]).

Parmi les avancées récentes, le rôle de l'IL21 dans l'homéostasie immunitaire semble également importante. Cette cytokine pro-inflammatoire, produite par les lymphocytes T CD4, aide à coordonner l'organisation de la réponse immune cellulaire et favorise la survie des cellules T cytotoxiques. Chez les patients HIC, le taux d'IL21 est maintenu, par opposition aux progressifs. Cela pourrait avoir un rôle dans le maintien des réponses T CD4 et T CD8 des patients *controllers* [38]. Le fonctionnement thymique des patients HIC est en cours d'étude avec des données qui suggéreraient que chez les patients *controllers*, les taux de sjTREC, reflétant la prolifération intrathymique, seraient plus élevés que chez les patients virémiques [39]. Nos données récentes (non publiées) semblent indiquer que, au contraire, le fonctionnement thymique serait normal chez les patients *controllers* et que chez les patients virémiques, le renouvellement thymique serait déficient.

Les lymphocytes T CD4 mémoires centraux sont préservés et polyfonctionnels chez les HIC. Leurs capacités de production de cytokines (IL2, IFN γ) et de lymphoprolifération sont conservées.

Rôle de l'immunité cellulaire T CD8

Plusieurs séries d'arguments sous-tendent le rôle primordial des lymphocytes T CD8 dans le contrôle de l'infection par le VIH chez les patients *controllers*. La surreprésentation de certains haplotypes HLA « protecteurs », dont HLA-B57 et B27, dans les populations de patients non progressifs, est un argument en faveur d'une réponse restreinte par le CMH de type I [18,19,40]. La réponse T CD8 serait ainsi optimisée par une meilleure présentation épitopique et une meilleure interaction CMH-peptide avec le TCR des lymphocytes T CD8 spécifiques du VIH. Néanmoins, le rôle précis de la molécule HLA B57 reste inconnu à l'heure actuelle.

Sur un plan fonctionnel, on a vu que les lymphocytes T CD4 de patients HIC sont infectés sans difficulté s'ils sont exposés au VIH. En revanche, nous avons montré que des cellules mononucléées sanguines (PBMC) de patients HIC étaient résistantes à l'infection et à la réplication du virus. Pour aller plus loin, seule la fraction T CD8 bloquait la réplication virale puisque cette réplication était détectable dans des fractions de PBMC déplétées en lymphocytes T CD8.

Nous avons ainsi pu montrer que les lymphocytes T CD8 éliminent les lymphocytes T CD4 infectés par une cytotoxicité nécessitant un contact cellulaire [18]. Cette capacité de blocage de la réplication virale est corrélée au nombre de lymphocytes T CD8 spécifiques du VIH quantifiés en ELISPOT IFN γ [41].

Notamment, les réponses lymphocytaires T CD8 spécifiques anti-gag semblent les plus importantes chez les patients *controllers* car ce sont celles qui sont corrélées au contrôle de la réplication virale [41]. Elles interviennent très tôt après l'infection, gag étant synthétisée avant l'expression des autres protéines virales [42]. En outre, la réponse anti-gag des patients B57+ semble conduire à la sélection de virus mutés dans le gène gag, entraînant une capacité de réplication virale réduite chez ces patients [11,43,44]. Cette pression de sélection n'est pas retrouvée chez les patients B57-, et n'est pas liée à un défaut viral intrinsèque. Néanmoins, la réponse anti-Nef semble également importante, au moins chez les patients B57+ [45].

Au plan quantitatif, la fréquence des lymphocytes T CD8 spécifiques anti-VIH est globalement importante chez les *controllers* mais avec des hétérogénéités marquées et sans différence significative avec les patients progressifs [18,46].

Au plan qualitatif, les lymphocytes T CD8 spécifiques du VIH sont polyfonctionnels, conservant leurs capacités de production de cytokines (IFN γ , IL2), de dégranulation et de cytotoxicité [47,48]. Ils gardent également leurs capacités de prolifération en réponse aux antigènes viraux [18].

Le phénotype de différenciation des lymphocytes T CD8 spécifiques est également particulier. Chez les patients progressifs, ces cellules restent dans un état de différenciation intermédiaire pouvant expliquer un contrôle viral imparfait. Chez les patients HIC, les phénotypes de différenciation se sont révélés très variables selon les patients et les peptides étudiés [18]. En revanche, l'état d'activation des lymphocytes T CD8 est particulier par une expression différentielle des molécules DR et CD38 conduisant au phénotype HLA-DR^{high}/CD38^{low}. L'expression faible de CD38 peut traduire une plus faible activation que chez les patients virémiques, explicable par une moindre exposition anti-

génique liée à la faible charge virale chez les *controllers*. La discordance avec l'expression forte de HLA-DR témoignerait des fortes capacités de prolifération de ces lymphocytes.

Enfin, d'autres analyses phénotypiques ont montré que les lymphocytes T CD8 spécifiques des patients *controllers* n'exprimaient pas CD57 et que l'expression de PD-1 était réduite chez ces patients [49]. Il existe une survie accrue de ces cellules spécifiques qui surexpriment la télomérase, une enzyme impliquée dans la survie cellulaire [50]. Ils seraient donc moins soumis au risque de sénescence et d'apoptose, ce qui leur permet de maintenir leurs fonctions effectrices.

La réponse T CD8 est importante chez les *controllers*, en particulier la réponse T CD8 spécifique anti-gag. Les lymphocytes T CD8 spécifiques sont cytotoxiques.

Rôle de l'immunité naturelle

Le rôle des cellules NK est de plus en plus étudié, mais les données disponibles chez les patients *controllers* sont limitées. Ces cellules jouent théoriquement un rôle fondamental dans la défense antivirale, par le biais d'une cytotoxicité cellulaire, directe ou médiée par les anticorps (ADCC) et par la production de cytokines telles l'IFN γ . La fonctionnalité des cellules *natural killer* (NK) est régulée entre autre par la balance entre des récepteurs activateurs et inhibiteurs à leur surface. Parmi ceux-ci, les *killer immunoglobulin-like receptors* (KIR) se subdivisent en récepteurs inhibiteurs et activateurs, reconnaissant des molécules du CMH à la surface des cellules infectées. Nous avons vu l'association protectrice entre certains allèles du gène *KIR3DL1* et le groupe HLA-Bw4.

Cependant, les données publiées sont controversées. O'Connell et al. [51] montrent que, si les NK sont capables d'inhiber la réplication virale dans les lymphocytes T CD4 autologues, ils semblent moins efficaces que les lymphocytes T CD8. En outre, aucune différence de répartition des allèles *KIR3DS1* et *KIR3DL1* n'a pu être mise en évidence par rapport à la population générale. Une étude très récente suggère un rôle probable des NK chez les patients HIC par le biais d'autres récepteurs, les *natural cytotoxicity receptor* (NCR) [52]. Leurs cellules NK CD3+ CD56+ ont en effet une activité cytotoxique et une capacité de production d'IFN γ importante in vitro, et cette activité contre les cellules T CD4 infectées pourrait faire intervenir le récepteur activateur NKp44.

Les données actuelles suggèrent un rôle des cellules NK chez les *controllers*, mais restent limitées.

Perspectives et conclusion

Les patients HIC représentent donc un modèle unique de contrôle spontané de l'infection VIH par le système immunitaire. Néanmoins, la compréhension de ce contrôle complexe, situé à plusieurs niveaux, reste imparfaite en 2010 même si la réponse immune semble jouer un rôle essentiel (Tableau 2). Notamment, cette réponse immune est-elle efficace car la réplication virale était limitée au départ ou bien la réplication virale a-t-elle été bloquée d'emblée par la réponse immunitaire ? Quel est le rôle des facteurs « protecteurs » (*human leucocyte antigen* [HLA B27/B57]) ?

Tableau 2 Mécanismes de contrôle de la propagation virale chez HIV controllers (HIC).
Mechanisms of control of HIV1 propagation in HIV controllers (HIC) patients.

| Le virus | Le génome | Le système immunitaire |
|--|---|--|
| Infectieux | Surreprésentation de HLA B27 et B57 | Pas de rôle majeur des AcN |
| Compétent pour la réplication | Gènes d'intérêt sur le chromosome 6 | ADCC efficace |
| Présent en de très faibles quantités | Sensibilité normale des LT CD4 au virus | Réponse T CD4 helper fonctionnelle |
| Capacités de réplication réduites si HLA B57 | | LT CD4 mémoires centraux préservés LT CD8 spécifiques anti-gag polyfonctionnels Cytotoxicité efficace (granzyme-perforine) Rôle des NK en cours d'étude |

AcN : anticorps neutralisants ; ADCC : *antibody dependant cell cytotoxicity* ; HLA : *human leucocyte antigen* ; LT : lymphocyte T ; NK : *natural killer*.

Le contrôle immunitaire semble s'établir très tôt lors de l'infection, mais ne préexiste pas avant la rencontre avec le virus. Notamment, il a pu être observé des patients suivis depuis leur primo-infection et développant un profil HIC [53]. Leurs caractéristiques seront très informatives dans la compréhension des mécanismes de contrôle antiviral. Ces patients ont des charges virales assez basses au départ, ce qui pourrait témoigner du rôle de l'immunité innée.

L'interface entre l'immunité innée et l'immunité adaptative a en effet probablement un rôle important, afin d'optimiser rapidement la réponse T CD8, dès la primo-infection. Les résultats des études Genome Wide Association semblent désigner des gènes impliqués dans l'immunité innée, tels les gènes MIC [22]. Des études sont ainsi en cours sur les cellules dendritiques ou les voies partagées des cellules NK et T CD8, telles NKG2D. Les patients HIC pourraient avoir une réponse innée plus efficace influençant le *priming* des lymphocytes T CD8.

De la même manière, le rôle de l'immunité muqueuse pourrait être important. Ferre et al. montrent l'existence de lymphocytes T CD8 activés dans la muqueuse rectale de patients HIC, par opposition aux patients traités par HAART [54]. Les muqueuses pourraient être des lieux essentiels de déclenchement d'une réponse immune efficace, au moment de la primo-infection notamment.

Une autre question importante est le devenir des patients HIC. Si leur définition clinique est homogène, ces patients sont hétérogènes en termes de nombre de lymphocytes T CD4 ou T CD8 spécifiques du VIH, ou en termes de capacité de contrôle de la réplication virale [30,36,41]. Cette hétérogénéité se traduit-elle par des profils cliniques différents ?

Dans l'étude américaine d'Okulicz, il semble que les patients *elite controllers* conservent en effet des taux de lymphocytes T CD4 élevés et ne progressent pas vers le Sida à la différence des *viremic controllers* chez qui 23 % finissent par être traités par anti-rétroviraux avec une baisse des taux de lymphocytes T CD4 [6].

Comme nous l'avons vu, le taux de réplication virale reste faible mais détectable par l'utilisation de techniques ultrasensibles chez les patients *controllers* [12,43]. Cette persistance du virus, même à de très faibles taux, induit probablement une stimulation antigénique suffisante pour le maintien d'une immunité spécifique efficace, qu'elle soit humorale ou cellulaire. Très récemment, une équipe a d'ailleurs montré que PD1, présent sur les lymphocytes T

CD8 spécifiques des patients *controllers*, était associé à une réplication virale faible mais présente [55].

Néanmoins, cette charge virale détectable, même très faible, peut avoir des conséquences à long terme [56]. Un contrôle viral imparfait pourrait témoigner de différences d'évolution entre les *elite* et les *viremic controllers* comme cela a été le cas entre les *controllers* et les patients ALT.

De même, l'hyperactivation du système immunitaire au cours de l'infection par le VIH qui pourrait être en partie liée à des altérations de la muqueuse digestive, est présente chez les patients *controllers*, même si c'est à un moindre inférieur à celui des patients virémiques [57]. Cette activation du système immunitaire pourrait induire une diminution du taux de lymphocytes T CD4 alors même que la réplication virale reste contrôlée [58,59].

Un suivi longitudinal est donc nécessaire afin d'étudier à la fois l'évolution clinique à long terme des patients, le retentissement psychosociologique de leur maladie et l'évolution des réponses immunitaires. Ce suivi permettra aussi d'étudier les rares pertes de contrôle du virus qui pourraient survenir.

C'est tout l'intérêt de la cohorte ANRS CO18 HIC qui a pris la suite de l'observatoire national des patients HIC, étape fondamentale pour leur recensement. Cette cohorte qui est ouverte pour cinq ans recrute des patients infectés par le VIH1 depuis plus de cinq ans, jamais traités par anti-rétroviraux, chez qui les cinq dernières charges virales consécutives sont inférieures à 400 copies/mL. Cet élargissement des critères d'inclusion permettra d'inclure davantage de patients, d'observer les rares pertes de contrôle et d'avoir des corrélations entre les différents paramètres immuno-virologiques. Les contacts pour inclure des patients dans cette cohorte sont les Drs Lambotte (olivier.lambotte@bc-t.aphp.fr) et Boufassa (faroudy.boufassa@inserm.fr).

Conflit d'intérêt

Aucun.

Références

- [1] Lefrere JJ, Morand-Joubert L, Mariotti M, Bludau H, Burghoffer B, Petit JC, et al. Even individuals considered as long-term non-progressors show biological signs of progression after 10 years of human immunodeficiency virus infection. *Blood* 1997; 90:1133–40.

- [2] Cao Y, Qin L, Zhang L, Safrit J, Ho DD. Virologic and immunologic characterization of long-term survivors of human immunodeficiency virus type 1 infection. *N Engl J Med* 1995;332:201–8.
- [3] Strathdee SA, Veugelers PJ, Page-Shafer KA, McNulty A, Moss AR, Schechter MT, et al. Lack of consistency between five definitions of non-progression in cohorts of HIV-infected seroconverters. *Aids* 1996;10:959–65.
- [4] Lambotte O, Boufassa F, Madec Y, Nguyen A, Goujard C, Meyer L, et al. HIV controllers: a homogeneous group of HIV-1-infected patients with spontaneous control of viral replication. *Clin Infect Dis* 2005;41:1053–6.
- [5] Grabar S, Selinger-Leneman H, Abgrall S, Pialoux G, Weiss L, Costagliola D. Prevalence and comparative characteristics of long-term non-progressors and HIV controller patients in the french hospital database on HIV. *Aids* 2009;23:1163–9.
- [6] Okulicz JF, Marconi VC, Landrum ML, Wegner S, Weintrob A, Ganesan A, et al. Clinical outcomes of elite controllers, viremic controllers, and long-term non-progressors in the us department of defence HIV natural history study. *J Infect Dis* 2009;200:1714–23.
- [7] Alexander L, Weiskopf E, Greenough TC, Gaddis NC, Auerbach MR, Malim MH, et al. Unusual polymorphisms in human immunodeficiency virus type 1 associated with non-progressive infection. *J Virol* 2000;74:4361–76.
- [8] Learmont JC, Geczy AF, Mills J, Ashton LJ, Raynes-Greenow CH, Garsia RJ, et al. Immunologic and virologic status after 14 to 18 years of infection with an attenuated strain of HIV-1. A report from the Sydney blood bank cohort. *N Engl J Med* 1999;340:1715–22.
- [9] Blankson JN, Bailey JR, Thayil S, Yang HC, Lassen K, Lai J, et al. Isolation and characterization of replication-competent human immunodeficiency virus type 1 from a subset of elite suppressors. *J Virol* 2007;81:2508–18.
- [10] Lamine A, Caumont-Sarcos A, Chaix ML, Saez-Cirion A, Rouzioux C, Delfraissy JF, et al. Replication-competent HIV strains infect HIV controllers despite undetectable viremia (ANRS ep36 study). *Aids* 2007;21:1043–5.
- [11] Miura T, Brockman MA, Brumme CJ, Brumme ZL, Carlson JM, Pereyra F, et al. Genetic characterization of human immunodeficiency virus type 1 in elite controllers: lack of gross genetic defects or common amino acid changes. *J Virol* 2008;82:8422–30.
- [12] Hatano H, Delwart EL, Norris PJ, Lee TH, Dunn-Williams J, Hunt PW, et al. Evidence for persistent low-level viremia in individuals who control human immunodeficiency virus in the absence of antiretroviral therapy. *J Virol* 2009;83:329–35.
- [13] Dean M, Carrington M, Winkler C, Huttley GA, Smith MW, Allikmets R, et al. Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to aids by a deletion allele of the CCR5 structural gene. Hemophilia growth and development study, multicenter aids cohort study, multicenter hemophilia cohort study, San Francisco city cohort, alive study. *Science* 1996;273:1856–62.
- [14] Hatzioannou T, Perez-Caballero D, Yang A, Cowan S, Bieniasz PD. Retrovirus resistance factors *ref1* and *lv1* are species-specific variants of *trim5alpha*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:10774–9.
- [15] Stremlau M, Owens CM, Perron MJ, Kiessling M, Autissier P, Sodroski J. The cytoplasmic body component *trim5alpha* restricts HIV-1 infection in old world monkeys. *Nature* 2004;427:848–53.
- [16] Mangeat B, Turelli P, Caron G, Friedli M, Perrin L, Trono D. Broad antiretroviral defence by human *apobec3g* through lethal editing of nascent reverse transcripts. *Nature* 2003;424:99–103.
- [17] Gandhi SK, Siliciano JD, Bailey JR, Siliciano RF, Blankson JN. Role of *apobec3g*/f-mediated hypermutation in the control of human immunodeficiency virus type 1 in elite suppressors. *J Virol* 2008;82:3125–30.
- [18] Saez-Cirion A, Lacabaratz C, Lambotte O, Versmisse P, Urrutia A, Boufassa F, et al. HIV controllers exhibit potent cd8 t cell capacity to suppress HIV infection ex vivo and peculiar cytotoxic t lymphocyte activation phenotype. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:6776–81.
- [19] Migueles SA, Sabbaghian MS, Shupert WL, Bettinotti MP, Marincola FM, Martino L, et al. HLA b*5701 is highly associated with restriction of virus replication in a subgroup of HIV-infected long term non-progressors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:2709–14.
- [20] Martin MP, Qi Y, Gao X, Yamada E, Martin JN, Pereyra F, et al. Innate partnership of HLA-b and *kir3dl1* subtypes against HIV-1. *Nat Genet* 2007;39:733–40.
- [21] Fellay J, Shianna KV, Ge D, Colombo S, Ledergerber B, Weale M, et al. A whole-genome association study of major determinants for host control of HIV-1. *Science* 2007;317:944–7.
- [22] Dalmasso C, Carpentier W, Meyer L, Rouzioux C, Goujard C, Chaix ML, et al. Distinct genetic loci control plasma HIV-RNA and cellular HIV-DNA levels in HIV-1 infection: The ANRS genome wide association O1 study. *PLoS One* 2008;3:e3907.
- [23] Deeks SG, Schweighardt B, Wrin T, Galovich J, Hoh R, Sinclair E, et al. Neutralizing antibody responses against autologous and heterologous viruses in acute versus chronic human immunodeficiency virus (HIV) infection: evidence for a constraint on the ability of HIV to completely evade neutralizing antibody responses. *J Virol* 2006;80:6155–64.
- [24] Li Y, Migueles SA, Welcher B, Svehla K, Phogat A, Louder MK, et al. Broad HIV-1 neutralization mediated by cd4-binding site antibodies. *Nat Med* 2007;13:1032–4.
- [25] Kloosterboer N, Groenewald PH, Jansen CA, van der Vorst TJ, Koning F, Winkel CN, et al. Natural controlled HIV infection: Preserved HIV-specific immunity despite undetectable replication competent virus. *Virology* 2005;339:70–80.
- [26] Mahalanabis M, Jayaraman P, Miura T, Pereyra F, Chester EM, Richardson B, et al. Continuous viral escape and selection by autologous neutralizing antibodies in drug-naïve human immunodeficiency virus controllers. *J Virol* 2009;83:662–72.
- [27] Bailey JR, Lassen KG, Yang HC, Quinn TC, Ray SC, Blankson JN, et al. Neutralizing antibodies do not mediate suppression of human immunodeficiency virus type 1 in elite suppressors or selection of plasma virus variants in patients on highly active antiretroviral therapy. *J Virol* 2006;80:4758–70.
- [28] Doria-Rose NA, Klein RM, Daniels MG, O'Dell S, Nason M, Lapedes A, et al. Breadth of human immunodeficiency virus-specific neutralizing activity in sera: clustering analysis and association with clinical variables. *J Virol* 2010;84:1631–6.
- [29] Lambotte O, Ferrari G, Moog C, Yates NL, Liao HX, Parks RJ, et al. Heterogeneous neutralizing antibody and antibody-dependent cell cytotoxicity responses in HIV-1 elite controllers. *Aids* 2009;23:897–906.
- [30] Pereyra F, Addo MM, Kaufmann DE, Liu Y, Miura T, Rathod A, et al. Genetic and immunologic heterogeneity among persons who control HIV infection in the absence of therapy. *J Infect Dis* 2008;197:563–71.
- [31] Lichterfeld M, Kaufmann DE, Yu XG, Mui SK, Addo MM, Johnston MN, et al. Loss of HIV-1-specific cd8+ t cell proliferation after acute hiv-1 infection and restoration by vaccine-induced HIV-1-specific cd4+ t cells. *J Exp Med* 2004;200:701–12.
- [32] Younes SA, Yassine-Diab B, Dumont AR, Boulassel MR, Grossman Z, Routy JP, et al. HIV-1 viremia prevents the establishment of interleukin 2-producing HIV-specific memory cd4+ t cells endowed with proliferative capacity. *J Exp Med* 2003;198:1909–22.
- [33] Harari A, Valleron F, Meylan PR, Pantaleo G. Functional heterogeneity of memory cd4 t cell responses in different conditions of antigen exposure and persistence. *J Immunol* 2005;174:1037–45.

- [34] Potter SJ, Lacabartz C, Lambotte O, Perez-Patriguez S, Vincent B, Sinet M, et al. Preserved central memory and activated effector memory cd4+ t-cell subsets in human immunodeficiency virus controllers: an ANRS ep36 study. *J Virol* 2007;81:13904–15.
- [35] Tilton JC, Luskin MR, Johnson AJ, Manion M, Hallahan CW, Metcalf JA, et al. Changes in paracrine interleukin-2 requirement, ccr7 expression, frequency, and cytokine secretion of human immunodeficiency virus-specific cd4+ t cells are a consequence of antigen load. *J Virol* 2007;81:2713–25.
- [36] Ems B, Sinclair E, Hatano H, Ferre A, Shacklett B, Martin JN, et al. HLA class i-restricted t-cell responses may contribute to the control of human immunodeficiency virus infection, but such responses are not always necessary for long-term virus control. *J Virol* 2008;82:5398–407.
- [37] Kannanganat S, Kapogiannis BG, Ibegbu C, Chennareddi L, Goepfert P, Robinson HL, et al. Human immunodeficiency virus type 1 controllers but not controllers maintain cd4 t cells coexpressing three cytokines. *J Virol* 2007;81:12071–6.
- [38] Iannello A, Boulassel MR, Samarani S, Debbeche O, Tremblay C, Toma E, et al. Dynamics and consequences of il-21 production in HIV-infected individuals: a longitudinal and cross-sectional study. *J Immunol* 2010; 184: 114–26.
- [39] Westrop SJ, Qazi NA, Pido-Lopez J, Nelson MR, Gazzard B, Gotch FM, et al. Transient nature of long-term non-progression and broad virus-specific proliferative t-cell responses with sustained thymic output in HIV-1 controllers. *PLoS One* 2009;4:e5474.
- [40] Gillespie GM, Stewart-Jones G, Rengasamy J, Beattie T, Bwayo JJ, Plummer FA, et al. Strong tcr conservation and altered t cell cross-reactivity characterize a b*57-restricted immune response in HIV-1 infection. *J Immunol* 2006;177:3893–902.
- [41] Saez-Cirion A, Sinet M, Shin SY, Urrutia A, Versmisse P, Lacabartz C, et al. Heterogeneity in HIV suppression by cd8 t cells from HIV controllers: association with gag-specific cd8 t cell responses. *J Immunol* 2009;182:7828–37.
- [42] Sacha JB, Chung C, Rakasz EG, Spencer SP, Jonas AK, Bean AT, et al. Gag-specific cd8+ t lymphocytes recognize infected cells before aids-virus integration and viral protein expression. *J Immunol* 2007;178:2746–54.
- [43] Miura T, Brockman MA, Schneidewind A, Lobritz M, Pereyra F, Rathod A, et al. HLA-b57/b*5801 human immunodeficiency virus type 1 elite controllers select for rare gag variants associated with reduced viral replication capacity and strong cytotoxic t-lymphocyte [corrected] recognition. *J Virol* 2009;83:2743–55.
- [44] Miura T, Brumme CJ, Brockman MA, Brumme ZL, Pereyra F, Block BL, et al. HLA-associated viral mutations are common in human immunodeficiency virus type 1 elite controllers. *J Virol* 2009;83:3407–12.
- [45] Bailey JR, Brennan TP, O'Connell KA, Siliciano RF, Blankson JN. Evidence of cd8+ t-cell-mediated selective pressure on human immunodeficiency virus type 1 nef in hla-b*57+ elite suppressors. *J Virol* 2009;83:88–97.
- [46] Addo MM, Draenert R, Rathod A, Verrill CL, Davis BT, Gandhi RT, et al. Fully differentiated HIV-1 specific cd8+ t effector cells are more frequently detectable in controlled than in progressive hiv-1 infection. *PLoS ONE* 2007;2:e321.
- [47] Betts MR, Nason MC, West SM, De Rosa SC, Migueles SA, Abraham J, et al. HIV non-progressors preferentially maintain highly functional HIV-specific cd8+ t cells. *Blood* 2006;107:4781–9.
- [48] Migueles SA, Osborne CM, Royce C, Compton AA, Joshi RP, Weeks KA, et al. Lytic granule loading of cd8+ t cells is required for HIV-infected cell elimination associated with immune control. *Immunity* 2008;29:1009–21.
- [49] Zhang JY, Zhang Z, Wang X, Fu JL, Yao J, Jiao Y, et al. Pd-1 up-regulation is correlated with hiv-specific memory cd8+ t-cell exhaustion in typical progressors but not in long-term non-progressors. *Blood* 2007;109:4671–8.
- [50] Lichterfeld M, Mou D, Cunn TD, Williams KL, Waring MT, Huang J, et al. Telomerase activity of HIV-1-specific cd8+ t cells: constitutive up-regulation in controllers and selective increase by blockade of pd ligand 1 in progressors. *Blood* 2008; 112:3679–87.
- [51] O'Connell KA, Han Y, Williams TM, Siliciano RF, Blankson JN. Role of natural killer cells in a cohort of elite suppressors: low frequency of the protective kir3ds1 allele and limited inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication in vitro. *J Virol* 2009;83:5028–34.
- [52] Vieillard V, Fausther-Bovendo H, Samri A, Debre P. Specific phenotypic and functional features of natural killer cells from HIV-infected long-term non-progressors and HIV controllers. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2010;53(5):564–73.
- [53] Goujard C, Chaix ML, Lambotte O, Deveau C, Sinet M, Guernon J, et al. Spontaneous control of viral replication during primary HIV infection: when is "HIV controller" status established? *Clin Infect Dis* 2009;49:982–6.
- [54] Ferre AL, Hunt PW, Critchfield JW, Young DH, Morris MM, Garcia JC, et al. Mucosal immune responses to HIV-1 in elite controllers: a potential correlate of immune control. *Blood* 2009;113:3978–89.
- [55] Salisch NC, Kaufmann DE, Awad AS, Reeves RK, Tighe DP, Li Y, et al. Inhibitory TCR coreceptor pd-1 is a sensitive indicator of low-level replication of SIV and HIV-1. *J Immunol* 2010; 184:476–87.
- [56] Pereyra F, Palmer S, Miura T, Block BL, Wiegand A, Rothchild AC, et al. Persistent low-level viremia in HIV-1 elite controllers and relationship to immunologic parameters. *J Infect Dis* 2009;200:984–90.
- [57] Brenchley JM, Price DA, Schacker TW, Asher TE, Silvestri G, Rao S, et al. Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Nat Med* 2006;12:1365–71.
- [58] Hunt PW, Brenchley J, Sinclair E, McCune JM, Roland M, Page-Shafer K, et al. Relationship between t cell activation and cd4+ t cell count in HIV-seropositive individuals with undetectable plasma HIV RNA levels in the absence of therapy. *J Infect Dis* 2008;197:126–33.
- [59] Sedaghat AR, Rastegar DA, O'Connell KA, Dinoso JB, Wilke CO, Blankson JN. T cell dynamics and the response to HAART in a cohort of HIV-1-infected elite suppressors. *Clin Infect Dis* 2009;49:1763–6.

Annexe 2 - NKG2D expression on HIV-Specific CD8 + T cells is reduced in viremic HIV-1 infected patients but maintained in HIV controllers

Camille Lecuroux, Asier Sáez-Ciri3n, Nicolas Noel, Lilia Ben-Lamine, Isabelle Girault, Sophie Caillat-Zucman, Daniel Scott-Algara, Alain Venet, Olivier Lambotte

Article publi3 dans *JAIDS* (Lecuroux et al., *J Acquir Immune Defic Syndr* 2013;62:17-20)

Outre son role dans la regulation de l'activation des cellules NK, NKG2D est une mol3cule importante de costimulation des lymphocytes T CD8.

Dans cet article, nous avons montr3 que l'expression de NKG2D 3 la surface des LT CD8 totaux comme des LT CD8 sp3cifiques du VIH des patients vir3miques 3tait r3duite comparativement 3 celles des patients HIV controllers. Par ailleurs, les traitements antir3troviraux permettaient de restaurer partiellement l'expression de NKG2D sur les CD8 sp3cifiques.

Enfin, une corr3lation n3gative 3tait observ3e entre l'expression de CD38 et de NKG2D sur les LT CD8 (totaux et sp3cifiques).

Ces donn3es sugg3raient une fonctionnalit3 de la voie NKG2D pr3serv3e sur les LT CD8 des HICs.

NKG2D Expression on HIV-Specific CD8⁺ T cells Is Reduced in Viremic HIV-1–Infected Patients but Maintained in HIV Controllers

Camille Lecuroux, PhD,* Asier Saez-Cirion, PhD,† Nicolas Noel, MD,* Lilia Ben-Lamine, PhD,*
Isabelle Girault,* Sophie Caillat-Zucman, PhD,‡ Daniel Scott-Algara, MD, PhD,†
Alain Venet, MD, PhD,* and Olivier Lambotte, MD, PhD*§||

Abstract: NKG2D mediates an important costimulatory pathway in CD8⁺ T cells. In HIV infection, the authors found that NKG2D expression on both total CD8⁺ and HIV-specific CD8⁺ T cells was significantly lower in viremic patients than in HIV controllers. Antiretroviral therapy partially restored NKG2D expression on HIV-specific CD8⁺ T cells. The authors observed a negative correlation between the respective expression levels of CD38 and NKG2D on total CD8⁺ and HIV-specific CD8⁺ T cells. The maintenance of NKG2D expression on CD8⁺ T cells in HIV controllers may contribute to better cell function.

Key Words: NKG2D, HIV-specific CD8⁺ T lymphocytes, inflammation, HIV controllers

(*J Acquir Immune Defic Syndr* 2013;62:17–20)

INTRODUCTION

The CD8⁺ T-cell response has a major role in limiting HIV replication, as has been demonstrated in simian models,¹ primary HIV infection (PHI),² and HIV controllers (HICs, ie, patients in whom HIV RNA is spontaneously undetectable).^{3,4} The mechanisms underlying the strong antiviral potential and long-term persistence of HIV-specific CD8⁺ T cells in HICs are not well understood. The NKG2D pathway could be involved in this phenomenon but remains largely unexplored in CD8⁺ T cells in HIV-infected patients.

NKG2D is expressed on natural killer (NK) cells and has a major role in NK-mediated cell lysis.^{5,6} It is also present on the vast majority of CD8⁺ αβT cells.^{5,7} On CD8⁺ T cells, NKG2D mediates a costimulatory pathway favoring proliferation, cytotoxicity, and a Th1 antigen-specific cell response.^{7–11}

Conversely, the protein is also involved in CD8⁺ T-cell immunoregulation and death. NKG2D ligands (NKG2DLs, such as the stress-inducible proteins MICA, MICB, and ULBPs) are induced on activated T cells. The expression of NKG2DLs may lead to the elimination of activated CD8⁺ T cells by NK cells, thus limiting their expansion.^{12,13} This could promote chronic viral infection, as has been recently reported.¹² Moreover, the release of NKG2DLs downregulates NKG2D expression on CD8⁺ T cells.^{14,15}

Although it was recently reported that the NKG2D pathway may have an impact on CD8⁺ T cells in HIV infection,¹¹ the mechanism remains largely unexplored. Thus, we decided to use flow cytometry to study the expression of NKG2D and its ligands on T cells, with a focus on HIV-specific CD8⁺ T cells in different groups of HIV-infected patients. We hypothesized that decreased expression of NKG2D and overexpression of NKG2DLs in viremic patients would lead to the death of HIV-specific T cells. In contrast, normal NKG2D expression in HICs would optimize cytotoxicity and cell proliferation.

PATIENTS AND METHODS

Four groups of patients were studied: PHI patients (n = 11) enrolled in the French ANRS PRIMO cohort,¹⁶ chronically HIV-1–infected patients with a viral load >10,000 RNA copies per milliliter (“viremic patients”) (n = 10), patients with undetectable plasmatic RNA viral load after long-term (>2 years) highly active antiretroviral treatment (HAART) (“treated patients”) (n = 11), and lastly, HICs (n = 15) enrolled in the French ANRS HIV Controllers cohort.¹⁷ The latter patients had been infected for more than 10 years and had never received HAART. Ninety percent of their plasma viral RNA assays were <400 copies per milliliter.

In addition, 13 healthy donors (HDs) were also studied. The experimental procedures with human blood were approved by an independent institutional review board (*Ile de France VII*) and were performed according to the European Union guidelines and the Declaration of Helsinki.

HIV-specific CD8⁺ T cells were identified with soluble allophycocyanin (APC)-labeled peptide-HLA class 1 multimers (Proimmune, Oxford, United Kingdom) derived from HIV proteins and then stained with antibodies directed against NKG2D [coupled to phycoerythrin (R&D Systems Europe,

Received for publication May 28, 2012; accepted September 13, 2012.

From the *INSERM, U1012, Le Kremlin Bicêtre, France; †Institut Pasteur, Unité de Régulation des Infections Rétrovirales, Paris, France; ‡INSERM U986, Hôpital St-Vincent de Paul, Paris, France; §Université Paris-Sud, U1012, Le Kremlin Bicêtre, France; and ||AP-HP, Service de Médecine Interne et Maladies Infectieuses, Hôpital Bicêtre, Le Kremlin Bicêtre, France. Supported by grants from Agence Nationale pour la Recherche contre le SIDA et les Hépatites virales (ANRS), Ensemble contre le SIDA (SIDACTION), INSERM, and Université Paris XI.

The authors have no conflicts of interest to disclose.

Correspondence to: Olivier Lambotte, MD, PhD, Service de Médecine Interne et Maladies Infectieuses, CHU Bicêtre, 78 rue du Général Leclerc, F-94275 Le Kremlin Bicêtre, France (e-mail: olivier.lambotte@bct.aphp.fr).

Copyright © 2012 by Lippincott Williams & Wilkins

Lille, France)], CD8 [coupled to peridinin chlorophyll protein-cyanine 5.5 (PerCP-Cy5.5)], and CD3 [coupled to APC-H7 (BD Biosciences, San Jose, CA)]. CD38 staining was performed with an antibody coupled to fluorescein isothiocyanate (BD Biosciences).

NKG2DLs staining was performed using anti-MICA, anti-MICB, anti-ULBP1, anti-ULBP2, and anti-ULBP3 antibodies coupled to phycoerythrin (MICA, MICB, ULBP2), fluorescein isothiocyanate (ULBP1), and APC (ULBP3) (R&D Systems Europe). The soluble MICA assay was kindly performed in S. Caillat-Zucman's laboratory. Statistical analysis was performed using analysis of variance tests.

RESULTS

NKG2D was strongly expressed on total CD8⁺ T cells from HDs (as described in the literature⁵) and HICs (82% ± 15% and 77% ± 20%, respectively) (Fig. 1A). In contrast, PHI patients showed significantly lower NKG2D expression on their CD8⁺ T cells (41% ± 22%; $P < 0.001$ and $P < 0.01$ when compared with HDs and HICs, respectively). Low expression was also observed on CD8⁺ T cells from viremic patients and treated patients (54% ± 18% and 52% ± 16%, respectively; $P < 0.05$ vs. HDs for both comparisons).

NKG2D expression was then studied on HIV-specific CD8⁺ T cells in HIV-infected patients (Fig. 1B). Importantly, expression was high in HICs (83% ± 14%). In contrast, viremic patients and PHI patients, all with high viral loads, displayed significantly lower expression of NKG2D on their HIV-specific CD8⁺ T cells, relative to HICs (59% ± 16% for PHI patients and 53% ± 18% for viremic patients; $P < 0.001$ vs. HICs for both comparisons). Treated patients displayed significantly higher expression of NKG2D on their HIV-specific CD8⁺ T cells (73% ± 16%) than viremic patients did ($P < 0.05$). Comparisons of the mean fluores-

cence intensity for NKG2D in each group of patients yielded similar results (data not shown).

This defect in NKG2D expression may contribute to impaired function in HIV-specific CD8⁺ T cells because we observed a positive correlation between NKG2D expression on one hand and the percentages of both IL-2⁺ and CFSE^{low} CD8⁺ T cells on the other hand ($P = 0.002$, $r = 0.49$, and $P = 0.031$, $r = 0.38$, respectively).

Our results suggest that HIV infection lowers the expression of NKG2D on total CD8⁺ and HIV-specific CD8⁺ T cells. We then investigated several possible mechanistic explanations for the much lower levels of NKG2D on CD8⁺ T cells from viremic patients.

First, reports in many settings have demonstrated that soluble forms of MHC class I chain-related (MIC) molecules induce NKG2D downmodulation in NK and T cells.^{14,15} We therefore tested for the presence of soluble MICA in the patients' plasma; however, low levels were found in all the groups (data not shown).

Second, activated CD8⁺ T cells may express NKG2DLs, which would lead to their killing by NK cells.^{12,13} We and others have reported that viremic subjects have higher activated CD8⁺ T-cell counts than HICs and HAART-treated patients.^{4,18} Thus, we hypothesized that there could be a negative correlation between NKG2D expression and CD38 expression and a positive correlation between NKG2DLs expression and CD38 expression in CD8⁺ T cells from untreated patients. Indeed, we observed a negative correlation between the respective expression levels of CD38 and NKG2D on total CD8⁺ T cells (Fig. 2A, $P = 0.0045$, $r = -0.35$) and HIV-specific CD8⁺ T cells (Fig. 2B, $P = 0.0003$ and $r = -0.46$). In contrast, we did not detect any significant ex vivo expression of MICA, MICB, or ULBP1, ULBP2, and ULBP3 on CD8⁺ T cells (data not shown) and therefore no correlation with activation of expression. This finding suggests either that there is a defect in NKG2DLs

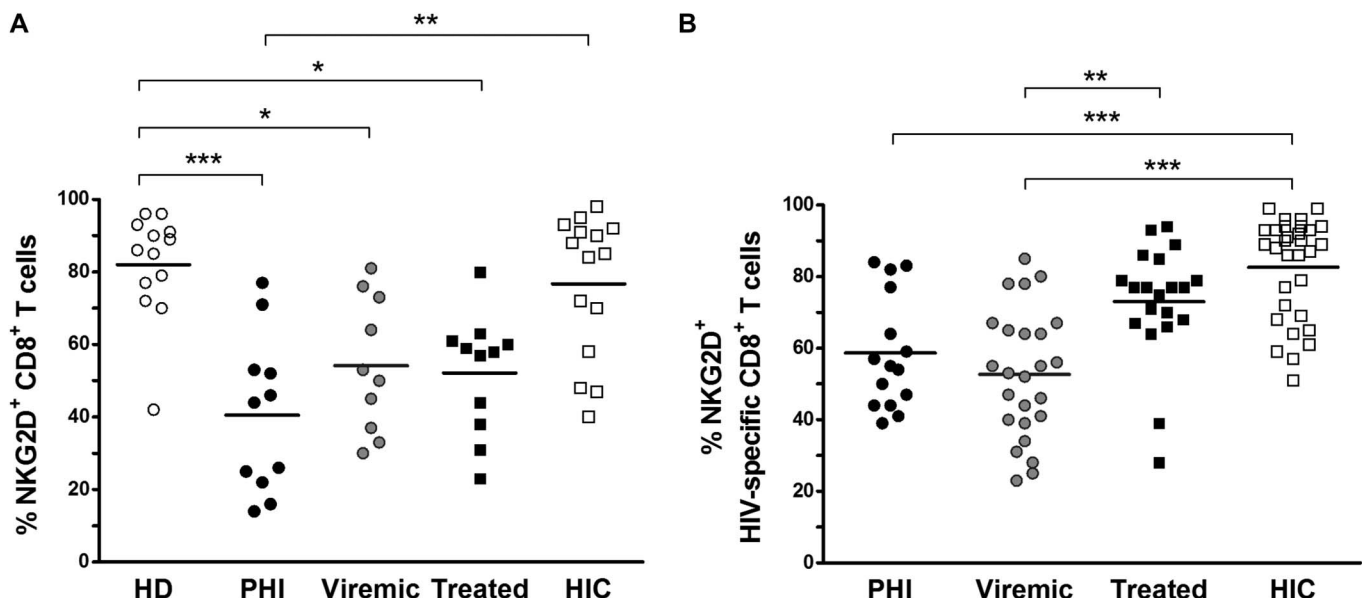
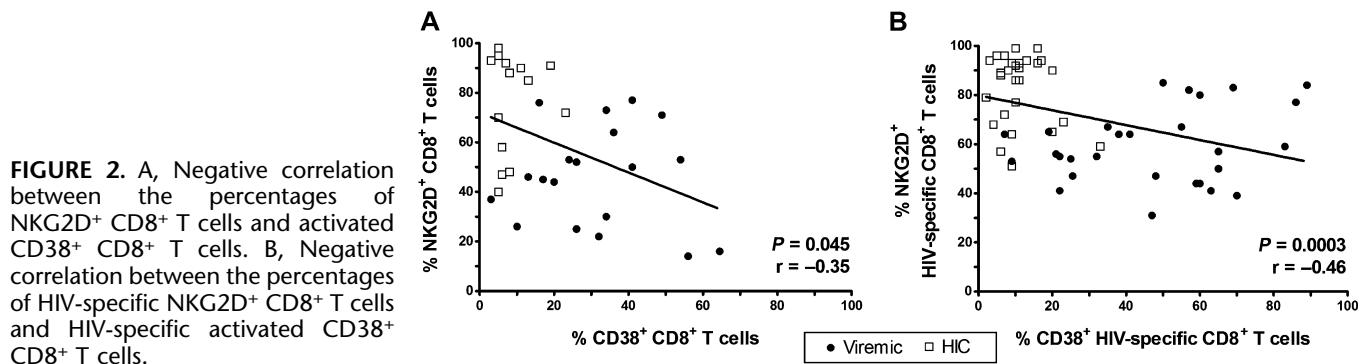


FIGURE 1. A, NKG2D expression on total CD8⁺ T cells [*** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ in an analysis of variance (ANOVA)]. B, NKG2D expression on HIV-specific CD8⁺ T cells from HIV-infected patients (*** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ in an ANOVA).



expression on CD8⁺ T cells in the setting of HIV infection or that NKG2DL-expressing activated CD8⁺ T lymphocytes are rapidly killed by NK cells.

To test the first hypothesis, we investigated the expression of NKG2DLs on CD8⁺ T cells after strong mitogenic activation (with a combination of anti-CD2 and anti-CD28 antibodies) in the different groups of patients. Each ligand tested was significantly and similarly induced in vitro on activated CD8⁺ T cells from each group (data not shown). Next, we looked at whether the level of NKG2D expression on NK cells could account for the killing of NKG2DL⁺ CD8⁺ T cells. We found that HDs and viremic patients did not differ significantly in terms of NKG2D expression on their NK cells ($74\% \pm 6\%$ and $69\% \pm 7\%$, respectively), as previously reported.¹⁹ Unexpectedly, NKG2D expression was significantly lower on NK cells from HICs when compared with those from viremic patients or HDs ($13\% \pm 3\%$, $P < 0.0001$ for both comparisons).

DISCUSSION

Our results suggest that HIV replication lowers the expression of NKG2D on total CD8⁺ and HIV-specific CD8⁺ T cells. This costimulatory defect may contribute to impaired function in anti-HIV CD8⁺ T cells. In contrast, NKG2D expression is maintained on total CD8⁺ and HIV-specific CD8⁺ T cells in HICs.

The level of immune activation may play a role in the regulation of NKG2D expression on CD8⁺ T cells because we observed a negative correlation between the respective expression levels of CD38 and NKG2D on total CD8⁺ T cells and HIV-specific CD8⁺ T cells. In the context of antiretroviral therapy, reduced activation might allow the reconstitution of a pool of HIV-specific NKG2D⁺ CD8⁺ T cells. Interestingly, normal expression of NKG2D on HIV-specific CD8⁺ T cells in HICs may be favored by the lower level of immune activation seen in these patients when compared with viremic individuals.¹⁸ Given that the MICA and MICB proteins are highly polymorphic,²⁰ rare alleles associated with reduced cell membrane expression of these proteins could be overrepresented in HICs (thus reducing CD8⁺ T-cell killing by NKG2D⁺ NK cells). Interestingly, a genome-wide association study of the HIC cohort showed that most of the tag single-nucleotide polymorphisms associated with low viral replication were located in the region ranging from HLA-Cw to MICB.²¹ Low in vivo induction of MICA or MICB on CD8⁺ T cells by physiological stimuli could lead to the greater maintenance of HIV-specific

NKG2D⁺ CD8⁺ T-cell function in HICs. This point deserves further attention.

However, we also showed that there was neither an overall nor a selective impairment of the expression of the various NKG2DLs on CD8⁺ T cells after in vitro cell activation. Our results thus suggest that NKG2DL⁺ CD8⁺ T cells are not detected ex vivo because they are killed in vivo by NKG2D⁺ NK cells. After looking at NKG2D expression on NK cells in viremic patients and HICs, our results are in accordance with the literature: in viremic patients, NKG2D expression is maintained on NK cells (in contrast to other killer-cell immunoglobulin-like receptors).¹⁹ The lower expression of NKG2D on NK cells in HICs has not been previously described and remains puzzling. Other peculiar phenotypic features in controllers have suggested the specific regulation of activating NK cell receptors in these patients.²² Low expression of NKG2D on NK cells might also facilitate the survival of HIV-specific CD8⁺ T cells in HICs.

This extensive study is the first to have described NKG2D expression on total CD8⁺ and HIV-specific CD8⁺ T cells in different groups of HIV-infected patients. We suggest that the maintenance of NKG2D expression on CD8⁺ T cell in HICs may help optimize CD8⁺ T-cell function and the anti-viral immune response in these patients, as recently suggested.¹¹ Therapeutic strategies based on reduced immune activation should be also beneficial in the maintenance of this cell activation pathway.

REFERENCES

- Schmitz JE, Kuroda MJ, Santra S, et al. Control of viremia in simian immunodeficiency virus infection by CD8⁺ lymphocytes. *Science*. 1999; 283:857–860.
- Kahn JO, Walker BD. Acute human immunodeficiency virus type 1 infection. *N Engl J Med*. 1998;339:33–39.
- Deeks SG, Walker BD. Human immunodeficiency virus controllers: mechanisms of durable virus control in the absence of antiretroviral therapy. *Immunity*. 2007;27:406–416.
- Saez-Cirion A, Lacabaratz C, Lambotte O, et al. HIV controllers exhibit potent CD8 T cell capacity to suppress HIV infection ex vivo and peculiar cytotoxic T lymphocyte activation phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104:6776–6781.
- Bauer S, Groh V, Wu J, et al. Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science*. 1999;285:727–729.
- Fogli M, Mavilio D, Brunetta E, et al. Lysis of endogenously infected CD4⁺ T cell blasts by rIL-2 activated autologous natural killer cells from HIV-infected viremic individuals. *PLoS Pathog*. 2008;4:e1000101.
- Raulet DH. Roles of the NKG2D immunoreceptor and its ligands. *Nat Rev Immunol*. 2003;3:781–790.

8. Barber A, Sentman CL. NKG2D receptor regulates human effector T-cell cytokine production. *Blood*. 2011;117:6571–6581.
9. Groh V, Rhinehart R, Randolph-Habecker J, et al. Costimulation of CD8 α T cells by NKG2D via engagement by MIC induced on virus-infected cells. *Nat Immunol*. 2001;2:255–260.
10. Jamieson AM, Diefenbach A, McMahon CW, et al. The role of the NKG2D immunoreceptor in immune cell activation and natural killing. *Immunity*. 2002;17:19–29.
11. Zloza A, Kohlhapp F, Lyons G, et al. NKG2D signaling on CD8 $^{+}$ T cells represses T-bet and rescues CD4-unhelped CD8 $^{+}$ T cell memory recall but not effector responses. *Nat Med*. 2012;18:422–429.
12. Lang PA, Lang KS, Xu HC, et al. Natural killer cell activation enhances immune pathology and promotes chronic infection by limiting CD8 $^{+}$ T-cell immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109:1210–1215.
13. Cerboni C, Zingoni A, Cippitelli M, et al. Antigen-activated human T lymphocytes express cell-surface NKG2D ligands via an ATM/ATR-dependent mechanism and become susceptible to autologous NK-cell lysis. *Blood*. 2007;110:606–615.
14. Groh V, Wu J, Yee C, et al. Tumor-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation. *Nature*. 2002;419:734–738.
15. Cerboni C, Ardolino M, Santoni A, et al. Detuning CD8 $^{+}$ T lymphocytes by down-regulation of the activating receptor NKG2D: role of NKG2D ligands released by activated T cells. *Blood*. 2009;113:2955–2964.
16. Dalod M, Dupuis M, Deschemin JC, et al. Weak anti-HIV CD8 $^{+}$ T-cell effector activity in HIV primary infection. *J Clin Invest*. 1999;104:1431–1439.
17. Boufassa F, Saez-Cirion A, Lechenadec J, et al. CD4 dynamics over a 15 year-period among HIV controllers enrolled in the ANRS French observatory. *PLoS One*. 2011;6:e18726.
18. Hunt PW, Brechley J, Sinclair E, et al. Relationship between T cell activation and CD4 $^{+}$ T cell count in HIV-seropositive individuals with undetectable plasma HIV RNA levels in the absence of therapy. *J Infect Dis*. 2008;197:126–133.
19. Mavilio D, Benjamin J, Daucher M, et al. Natural killer cells in HIV-1 infection: dichotomous effects of viremia on inhibitory and activating receptors and their functional correlates. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100:15011–15016.
20. Stephens H. MICA and MICB genes: can the enigma of their polymorphism be resolved? *Trends Immunol*. 2001;22:378–385.
21. Dalmaso C, Carpentier W, Meyer L, et al. Distinct genetic loci control plasma HIV-RNA and cellular HIV-DNA levels in HIV-1 infection: the ANRS Genome Wide Association 01 study. *PLoS One*. 2008;3:e3907.
22. Vieillard V, Fausther-Bovendo H, Samri A, et al. Specific phenotypic and functional features of natural killer cells from HIV-infected long-term nonprogressors and HIV controllers. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2010;53:564–573.

Annexe 3 –Communications des travaux de thèse

-Canoui E, Noel N, Lecuroux C, Bourgeois C, Lambotte O. **Profil d'expression des gènes induits par l'interféron chez les patients HIV controllers: analyse de la cohorte ANRS CoDEx CO21**. 70^{ème} Congrès de la SNFMI, Paris, 10-12 Décembre 2014. (*Orateur : Etienne Canoui*)

-Noel N, Lerolle N, Lecuroux C, Goujard C, Venet A, Boufassa F, Lambotte O. **Risque de progression immunologique et/ou virologique chez les patients « HIV controllers » : analyse des facteurs cliniques et immunologiques (cohorte ANRS CO21 CODEX)**. 69^{ème} Congrès de la SNFMI, Bastia, 18-20 Juin 2014. (*Orateur : Nicolas Noel*)

-Lerolle N, Noel N, Lecuroux C, Goujard C, Boufassa F, Lambotte O. **Fréquence et facteurs de risque d'échappement chez les patients « HIV controllers**. 15^{ème} Journées Nationales d'Infectiologie, Bordeaux, 11-13 Juin 2014. (*Orateur : Nathalie Lerolle*)

-Noel N, Boufassa F, Lecuroux C, Saez-Cirion A, Girault I, Conti M, Hua S, Bourgeois C, Goujard C, Venet A, Lambotte O. **IP10 and sCD163 are biomarkers of CD4+ T cells decline and immune activation in HIV controllers patients**. Abstract A-581-0048-02077. 7th IAS Conference on HIV Pathogenesis, Treatment and Prevention. Kuala Lumpur, Malaysia, 30 June - 3 July 2013. (*Orateur : Olivier Lambotte*)

-Noel N. **IP10 et CD163 soluble sont associés à l'activation immune et à des taux bas de lymphocytes T CD4 chez les patients "HIV controllers"**. 13^{ème} Journées de l'Ecole Doctorale Innovation Thérapeutique, 17-18 Juin 2013. (*Orateur : Nicolas Noel*)

- Noel N, Boufassa F, Lecuroux C, Saez-Cirion A, Meyer L, Pancino G, Rouzioux C, Theodorou I, Venet A, Lambotte O. **Caractéristiques des patients « HIV controllers » : résultats de la cohorte ANRS CO18**. 67^{ème} Congrès de la SNFMI, Marseille, 5-7 Juin 2013. (*Orateur : Nicolas Noel*)

-Noel N, Boufassa F, Lecuroux C, Saez-Cirion A, Conti M, Hua S, Bourgeois C, Pancino G, Goujard C, Venet A, Lambotte O. **IP10 et CD163 soluble sont des biomarqueurs corrélés au déclin lymphocytaire T CD4 et à l'activation immune chez les patients « HIV controllers »**. 67^{ème} Congrès de la SNFMI, Marseille, 5-7 Juin 2013. (*Orateur : Nicolas Noel*)

RESUME EN FRANÇAIS

Les patients HIV controllers (HICs) sont des patients infectés par le VIH contrôlant spontanément la réplication virale sans traitement anti-rétroviral (TARV). Certains de ces patients présentent, au cours de leur suivi, une baisse de leurs lymphocytes T CD4 (LT CD4) et parfois, perdent le contrôle antiviral. Nous avons ainsi voulu étudier les paramètres d'activation immunitaire et d'inflammation systémique chez ces patients.

Dans le travail n°1, nous avons quantifié plusieurs biomarqueurs de l'inflammation, et nous avons mis en évidence qu'en dépit d'une charge virale ARN VIH très faible, les HICs présentaient des taux de TNF α , IP10 et CD14 soluble anormalement élevés. La chimiokine IP10, produite sous l'effet des IFN de type I et II, était celle qui permettait le mieux de distinguer le profil inflammatoire des HICs par rapport aux témoins non infectés ou aux patients progressseurs. Notamment, les taux d'IP10 étaient inversement corrélés aux LT CD4 circulants. Nous avons poursuivi cette analyse dans le Travail n°2 par l'analyse en qPCR de gènes induits par l'Interféron (ISGs), au sein des LT CD4, LT CD8 et monocytes triés *ex vivo*. Le niveau d'expression des ISGs et leur régulation étaient différents selon le type cellulaire. En outre, le gène *ifitm1* était surexprimé au sein des LT CD4 des HICs. Son rôle exact mérite d'être caractérisé précisément. Enfin, nous avons analysé les causes d'échappement immunologique et virologique des HICs de la cohorte ANRS CO21 CODEX, montrant que les taux de LT CD4, de charge virale ultra-sensible et d'IP10 à l'inclusion étaient anormaux chez les patients à risque d'échappement.

Ces résultats soulignent donc que chez certains HICs, une inflammation anormale persiste. La place de ces biomarqueurs pour identifier les HICs à risque de progresser, chez lesquels un TARV devrait être instauré, doit être précisée. De même, le ciblage de ces voies d'activation immunitaire doit être étudié afin d'en réduire les conséquences.

SUMMARY

HIV controllers patients (HICs) are HIV-infected patients who spontaneously control the viral replication without anti-retroviral treatment (ART). Some of these patients experience a decline of their CD4 T cell count (CD4 Tc) and/or lose their ability to control the virus during follow-up. Our aim was to study the parameters of immune activation and systemic inflammation in such settings.

In the first article, we quantified several biomarkers of inflammation in HICs, and we highlighted that despite very low circulating HIV RNA viral load, HICs had higher levels of TNF α , soluble CD14 and IP10 than healthy volunteers. IP10, depending on the production of type I and II IFN, was the one that allowed the better distinction in the inflammatory profile of HICs compared with uninfected controls or viremic patients. In particular, IP10 levels were negatively correlated to circulating CD4 T cell counts. We continued this analysis by performing qPCR analyses of the expression of 4 Interferon stimulated genes (ISGs) in sorted circulating CD4 T lymphocytes, CD8 T lymphocytes and monocytes *ex vivo*. The level of ISGs and their regulation differed depending on the cell type. In addition, *Ifitm1* was overexpressed in HICs' CD4 T cells. His precise role in antiviral control and/or regulation of inflammation should be further characterized. Lastly, we analyzed the immunological and virological progression causes in the HICs ANRS CO21 CODEX cohort, showing that CD4 T cell counts (nadir and at inclusion), as well as ultra-sensitive HIV viral load and IP10 levels at inclusion were abnormal in patients at risk of progression. These results point out that in some HICs, abnormal inflammation persists. The role of these biomarkers in the biological follow up of HICs must be specified to better identify patients at risk of progression, in which ART should

be earlier initiated. Similarly, immunomodulatory drugs should be further studied in order to reduce the long term consequences of persistent inflammation in HICs.

RESUME

Les patients HIV controllers (HICs) sont des patients infectés par le VIH contrôlant spontanément la réplication virale sans traitement anti-rétroviral (TARV). Certains de ces patients présentent, au cours de leur suivi, une baisse de leurs lymphocytes T CD4 (LT CD4) et parfois, perdent le contrôle antiviral. Nous avons ainsi voulu étudier les paramètres d'activation immunitaire et d'inflammation systémique chez ces patients.

Dans le travail n°1, nous avons quantifié plusieurs biomarqueurs de l'inflammation, et nous avons mis en évidence qu'en dépit d'une charge virale ARN VIH très faible, les HICs présentaient des taux de TNF α , IP10 et CD14 soluble anormalement élevés. La chimiokine IP10, produite sous l'effet des IFN de type I et II, était celle qui permettait le mieux de distinguer le profil inflammatoire des HICs par rapport aux témoins non infectés ou aux patients progressseurs. Notamment, les taux d'IP10 étaient inversement corrélés aux LT CD4 circulants. Nous avons poursuivi cette analyse dans le Travail n°2 par l'analyse en qPCR de gènes induits par l'Interféron (ISGs), au sein des LT CD4, LT CD8 et monocytes triés *ex vivo*. Le niveau d'expression des ISGs et leur régulation étaient différents selon le type cellulaire. En outre, le gène *ifitm1* était surexprimé au sein des LT CD4 des HICs. Son rôle exact mérite d'être caractérisé précisément. Enfin, nous avons analysé les causes d'échappement immunologique et virologique des HICs de la cohorte ANRS CO21 CODEX, montrant que les taux de LT CD4, de charge virale ultra-sensible et d'IP10 à l'inclusion étaient anormaux chez les patients à risque d'échappement.

Ces résultats soulignent donc que chez certains HICs, une inflammation anormale persiste. La place de ces biomarqueurs pour identifier les HICs à risque de progresser, chez lesquels un TARV devrait être instauré, doit être précisée. De même, le ciblage de ces voies d'activation immunitaire doit être étudié afin d'en réduire les conséquences.